

THÈSES

présentées à la

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

par

René FRENTZ

PREMIÈRE THÈSE :

Contribution à l'étude biochimique
du milieu intérieur de *Carcinus maenas* Linné

DEUXIÈME THÈSE :

Propriétés immunologiques des protéines végétales

soutenues le 23 Avril 1960 devant la Commission d'Examen

JURY :

MM. A. VEILLET, *Président*

P. REMY

R. ECHEVIN

P. GRABAR

} *Examineurs*

1960



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555809_0020

THÈSES

présentées à la

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

par

René FRENTZ

PREMIÈRE THÈSE :

Contribution à l'étude biochimique
du milieu intérieur de *Carcinus maenas* Linné

DEUXIÈME THÈSE :

Propriétés immunologiques des protéines végétales

soutenues le 23 Avril 1960 devant la Commission d'Examen

JURY :

MM. A. VEILLET, *Président*

P. REMY

R. ECHEVIN

P. GRABAR

} *Examineurs*

NANCY

SOCIÉTÉ D'IMPRESSIONS TYPOGRAPHIQUES

1960

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY

Doyen : M. URION.

Assesseur : M. ECHEVIN.

Doyens honoraires : MM. CORNUBERT, DELSARTE.

Professeurs honoraires :

MM. GUTTON, GROZE, RAYBAUD, FALLOT, LAFFITTE, LERAY, DONZELOT, JOLY, LAPORTE, EICHBORN, CAPELLE, GODEMENT, DUBREIL, L. SCHWARTZ, DIEUDONNÉ, DE MALLEMANN, LONGCHAMON, LETORT, DODÉ, GAUTHIER, GOUDET, OLMER, CORNUBERT, CHAPELLE.

Maîtres de Conférences honoraires : MM. RAUX, LIENHART.

Professeurs :

MM.		MM.	
CHEVALLIER	Physique.	BOLFA	Minéralogie.
URION	Chimie biologique.	NICLAUSE	Chimie.
DELSARTE	Analyse supérieure.	FAIVRE	Physique appliquée.
RÉMY	Zoologie.	AUBRY	Chimie minérale.
ROUBAULT	Géologie.	COMOLET	Mécanique physique.
VEILLET	Biologie animale.	DUVAL	Chimie.
ECHEVIN	Botanique.	COPPENS	Radiogéologie.
WAHL	Chimie organique industrielle.	FRUHLING	Physique.
BARRIOL	Chimie théorique.	LIONS	M. M. P.
BIZETTE	Physique.	SUHRER	Physique expérimentale.
GUILLEN	Electronique.	HILLY	Géologie.
GIBERT	Chimie physique.	LE GOFF	Génie chimique.
HERVÉ	Calcul différentiel et intégral.	CHAPON	Chimie biologique.
LEGRAS	Mécanique rationnelle.	HEROLD	Chimie industrielle.
DAVID	Chimie organique.	SCHWARTZ	Exploitation minière.

Maîtres de Conférences :

MM.		MM.	
WERNER	Botanique.	BERNARD	Géologie.
GAYET	Physiologie.	ARAGNOL	Mathématiques (prop.)
MANGENOT	Phytopathologie.	BONVALET	Mécanique appliquée.
GARNIER	Agronomie.	BASTICK	Chimie.
BRUHAT	Mathématiques générales.	RENARD	Physique théorique et nucléaire.
HADNI	Physique.	CONDÉ	Zoologie.
M ^{me} ROIZEN	Physique.	GOSSE	Génie chimique.
MALAPRADE	Chimie.	CHAMPIER	Physique.
RÉGNIER	Physico-chimie.	GAY	Chimie biologique.
KERN	Minéralogie.	CLIN	Stratigraphie et Paléontologie.
WEPPE	Minéralogie appliquée.	N.	Géologie.
LERMUSIAUX	Physique.		

Secrétaire : M. LAPOINTE.



Contribution à l'étude biochimique
du milieu intérieur de *Carcinus maenas* Linné

TABLE DES MATIÈRES

AVANT - PROPOS	1
INTRODUCTION	3
CHAPITRE I. — Le Matériel étudié	7
I. — PROVENANCE DES ANIMAUX	7
II. — TECHNIQUES D'ÉLEVAGE	8
III. — BIOLOGIE SOMMAIRE DE <i>Carcinus maenas</i>	10
A. — <i>Développement et croissance</i>	10
1. Ponte	10
2. Développement	10
3. Mues et croissance	10
B. — <i>Sexualité</i>	12
1. Ses manifestations	12
2. Son déterminisme	12
C. — <i>Corrélations hormonales</i>	13
D. — <i>Parasitisme du Crabe par la Sacculine</i>	14
1. Description du phénomène	14
2. Action sur la mue et la croissance.....	15
3. Action sur la sexualité	15
a) Chez les mâles (p. 15) - b) Chez les femelles (p. 16).	
4. Interprétations du phénomène	17
IV. — CONNAISSANCE BIOCHIMIQUE ANTÉRIEURE DE L'HÉMOLYPHE DES CRABES NORMAUX ET SACCULINES	18
CHAPITRE II. — Etude des lipides chez <i>Carcinus maenas</i> indemne et sacculiné	21
I. — L'HYPOTHÈSE DE G. SMITH	21
A. — <i>Sa genèse</i>	21
B. — <i>Ses fondements</i>	23
C. — <i>Sa substance</i>	24
D. — <i>Ses contrôles</i>	25
E. — <i>Sa critique</i>	27

II. — RÉFUTATION EXPÉRIMENTALE DE CETTE HYPOTHÈSE	28
A. — <i>Généralités</i>	28
B. — <i>Méthodologie</i>	28
1. Récolte des animaux	28
2. Conservation des animaux	29
3. Classification et mesures	29
a) Distinction des sexes (p. 29) - b) Animaux à carapace molle (p. 29) - c) Animaux à Sacculine externe (p. 29) - d) Femelles en vitellogenèse ou œuvées (p. 30) - e) Mesures de taille (p. 30) - f) Mesures de féminisation (p. 30).	
4. Analyses chimiques	30
a) Principe (p. 30) - b) Dessiccation des Crabes (p. 34) - c) Pesées (p. 34) - d) Broyage (p. 34) - e) Saponification (p. 34) - f) Extractions (p. 34) - g) Expression des résultats (p. 32).	
C. — <i>Résultats</i>	33
1. Crabes ♂	33
a) Sans Sacculine externe (p. 33) - Données numériques de l'échantillon (p. 33) - Corrélation entre les lipides et la taille (p. 36) - Corrélation entre les lipides et la féminisation (p. 36) - Conclusions (p. 40).	
b) Avec Sacculine externe jeune (p. 40) - Remarques biologiques (p. 44) - Analyses lipidiques (p. 45).	
c) Avec Sacculine externe bien développée (p. 46).	
2. Crabes ♀	47
a) Sans Sacculine externe (p. 47) - b) Avec Sacculine externe indemne (p. 49) - c) Avec Sacculine externe enlevée (p. 50) - d) Femelles indemnes, en vitellogenèse (p. 50) - e) Femelles indemnes et ovigères (p. 51) - f) Femelles indemnes, ovigères, à ponte enlevée (p. 52).	
D. — <i>Conclusions</i>	52
CHAPITRE III. — Recherches hormonales chez <i>Carcinus maenas</i>	55
I. — RECHERCHE DE SUBSTANCES STÉROIDES	55
A. — <i>But poursuivi</i>	55
B. — <i>Recherche des 17-cétostéroïdes totaux</i>	56
1. Principe	56
2. Préparation du matériel	57
a) Testicules (p. 57) - b) Hémolymphe (p. 57) - c) Hépatopancreas (p. 57)	
3. Hydrolyse	58
4. Extraction	58
5. Lavages	58
6. Dessiccation	58
7. Réaction de caractérisation	58
8. Résultats	58
a) Testicules (p. 58) - b) Hémolymphe (p. 59) - c) Hépatopancreas (p. 59).	
9. Conclusions	59
C. — <i>Recherche de 17-cétostéroïdes après fractionnement chromatographique</i>	60
1. Principe	60
2. Mode opératoire	60
a) Colonne (p. 60) - b) Elution (p. 61) - c) Evaporation des fractions (p. 61) - d) Colorimétrie (p. 63).	

TABLE DES MATIERES

IX

3. Résultats	63
a) Testicules (p. 63) - b) Hémolymphe (p. 65) - c) Hépatopancreas (p. 65)	
4. Conclusions	65
II. — INJECTIONS D'HORMONES PURES DE VERTÉBRÉS	66
A. — <i>Hormones gonadotropes</i>	66
1. Technique	66
2. Résultats	67
B. — <i>Hormone somatotrope</i>	67
1. Technique	67
2. Résultats	67
C. — <i>Hormone adrénocorticotrope</i>	68
1. Technique	68
2. Résultats	68
D. — <i>Hormones androgènes</i>	68
1. Technique	68
2. Résultats	68
E. — <i>Hormones oestrogènes</i>	69
1. Technique	69
2. Résultats	69
F. — <i>Conclusions</i>	69
III. — INJECTIONS D'EXTRAITS DE SACCULINE	70
A. — <i>But</i>	70
B. — <i>Préparation de l'extrait</i>	70
C. — <i>Les injections</i>	71
D. — <i>Résultats</i>	71
IV. — INJECTIONS DE SÉRUM DE CRABE SACCULINE	71
V. — ALIMENTATION DE CRABES AVEC DES SACCULINES	71
VI. — CONCLUSIONS	72

CHAPITRE IV. — Etude des acides-aminés de l'hémolymphe de <i>Carcinus maenas</i> par chromatographie sur papier	73
I. — GÉNÉRALITÉS	73
II. — TECHNIQUE DE CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER	74
A. — <i>Principe</i>	74
B. — <i>Prélèvement</i>	74
C. — <i>Dessiccation</i>	74
D. — <i>Extraction des acides-aminés</i>	74
E. — <i>Délipidation</i>	75
F. — <i>Chromatographie en une dimension</i>	75
G. — <i>Chromatographie bidimensionnelle</i>	75
III. — RÉSULTATS	76
A. — <i>Acides-aminés libres du sérum</i>	76

B. — <i>Acides-aminés des hydrolysats de sérum</i>	77
IV. — CONCLUSIONS	78
CHAPITRE V. — Etude des protéines du sérum de <i>Carcinus maenas</i> par électrophorèse	79
I. — GÉNÉRALITÉS	79
A. — <i>Introduction</i>	79
B. — <i>Principe de l'électrophorèse</i>	80
C. — <i>Travaux antérieurs</i>	81
II. — ÉLECTROPHORÈSE SUR PAPIER	86
A. — <i>Introduction</i>	86
B. — <i>Description de l'appareil</i>	87
C. — <i>Mode opératoire</i>	87
1. Préparation du papier	87
2. Préparation de la cuve	88
3. Préparation du sérum	88
4. Dépôt du sérum	89
5. Electrophorèse	90
6. Colorations et lavages	90
a) Colorations générales des protéines (p. 91) - Bleu de bromophénol (p. 91) - Amidoschwarz (p. 91) - b) Coloration des glycoprotéides (p. 91) - c) Coloration des lipoprotéines (p. 92).	
7. Photométrie	93
8. Essais comparatifs avec d'autres appareils	93
D. — <i>Organisation générale des essais</i>	94
E. — <i>Résultats</i>	94
1. Essais préliminaires	94
2. Variations électrophorétiques des protéines du sérum d'un échantillon de population de <i>Carcinus maenas</i> de la Manche	95
a) Description des fractions (p. 95) - b) Etude des mâles (p. 97) - Mâles normaux (p. 97) - Mâles sacculinés (p. 97) - Mâles privés de leurs pédoncules oculaires (p. 98) - Etude des femelles (p. 99) - Femelles normales (p. 99) - Femelles normales ovigères (p. 101) - Femelles à Sacculine externe (p. 101) - Femelles sans pédoncules oculaires (p. 101) - d) Conclusions (p. 101).	
3. Variations électrophorétiques du sérum de <i>Carcinus maenas</i> en élevage	102
a) Généralités (p. 102) - b) Etude des mâles normaux (p. 102) - c) Etude des femelles normales (p. 103) - Remarques biologiques concernant la ponte (p. 103) - Protéinogrammes (p. 104) - d) Conclusions (p. 105).	
4. Variations électrophorétiques des protéines du sérum d'un échantillon de population de <i>Carcinus maenas</i> de l'Etang de Thau	106
a) Etude des mâles (p. 106) - Mâles normaux (p. 106) - Mâles sacculinés (p. 106) - b) Etude des femelles (p. 108) - Femelles normales (p. 108) - Femelles sacculinées (p. 109) - c) Conclusions (p. 109).	
5. Variations électrophorétiques des protéines du sérum d'un échantillon hivernal ♀ de la population de <i>Carcinus maenas</i> de l'Etang de Thau	110
a) Femelles en vitellogenèse (p. 110) - b) Femelles ovigères (p. 111) - c) Conclusions (p. 111).	

6. Variations électrophorétiques saisonnières des protéines du sérum de <i>Carcinus maenas</i> de Roscoff	112
a) Méthodologie (p. 112) - b) Résultats (p. 113).	
7. Nature des fractions protéiques isolées	116
a) Hémocyanine (p. 117) - b) Glycoprotéides (p. 117) - c) Lipoprotéines (p. 118) - d) Conclusions (p. 119).	
III. — ELECTROPHORÈSE EN GÉLOSE	119
A. — <i>Principes et avantages</i>	120
B. — <i>Mise au point d'une cuve à électrophorèse à usages multiples</i>	120
1. Description	120
2. Fonctionnement	123
a) Montage général (p. 123) - b) Electrophorèse sur papier (p. 125) - c) Electrophorèse en gélose (p. 125) - Grand format (p. 125) - Format réglable (p. 126) - d) Immuno-électrophorèse (p. 127) - e) Micro-immuno-électrophorèse (p. 127) - f) Electrophorèse en bloc d'amidon (p. 128) - g) Electrophorèse en gel d'amidon (p. 128).	
C. — <i>Electrophorèse en gélose du sérum de Carcinus maenas</i>	129
1. Technique utilisée	129
a) Préparation de la gélose (p. 129) - b) Préparation des plaques (p. 130) - c) Electrophorèse (p. 131) - d) Fixation (p. 131) - e) Séchage (p. 131) - f) Colorations et lavages (p. 132) - Coloration générale des protéines (p. 132) - Coloration des lipoprotéines (p. 132) - Coloration des glycoprotéides (p. 133) - g) Microélectrophorèse (p. 133).	
2. Rappel des propriétés des hémocyanines	134
3. Résultats	137
a) Fractionnement de l'hémocyanine en gélose (p. 137) - b) Autres fractions protéiques (p. 140).	
IV. — IMMUNO-ELECTROPHORÈSE EN GÉLOSE	140
A. — <i>Genèse</i>	141
1. Technique d'LOUDIN	142
2. Technique d'OUCHTERLONY	142
B. — <i>Principe</i>	143
C. — <i>Application au sérum de Carcinus maenas</i>	144
1. Préparation des immunsérums	144
2. Etude comparative des immunsérums	146
a) Technique (p. 146) - b) Résultats (p. 147).	
3. Immuno-électrophorèse	148
a) Technique (p. 148) - b) Résultats (p. 150).	
D. — <i>Conclusions</i>	153
V. — ELECTROPHORÈSE EN GEL D'AMIDON	154
A. — <i>Introduction</i>	154
B. — <i>Technique</i>	154
1. Hydrolyse de l'amidon	154
2. Préparation du gel	155
3. Coulée du gel	155

4. Insertion des échantillons	156
a) Insertion sur papier filtre (p. 156) - b) Insertion en pâte d'amidon (p. 156)	
5. Le tampon	157
6. Electrophorèse	157
7. Coloration	157
C. — <i>Résultats</i>	158
1. Essais avec différents tampons	158
a) Tampon borate (p. 158) - b) Tampon véronal/HCl (p. 160).	
2. Nature des fractions mises en évidence	160
3. Mise au point d'une microméthode	162
D. — <i>Conclusions</i>	164
RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS	165
BIBLIOGRAPHIE	171

AVANT-PROPOS

RIEN,
DE CE QUI SE FAIT,
N'EST L'ŒUVRE D'UN SEUL.
IL N'EST QUE JUSTICE DE LE SOULIGNER.

Notre reconnaissance sincère et profonde va, en premier lieu, à M. le Professeur André VEILLET, initiateur et conseiller de ces recherches. Depuis qu'il assume la lourde charge de diriger à la fois l'Institut de Biologie et l'Ecole de Laiterie de la Faculté des Sciences de Nancy, nous avons eu l'honneur et la chance d'être son collaborateur. C'est dire que, pendant treize ans, nous avons profité de son savoir et de son exemple. Sa connaissance parfaite du matériel d'étude, alliée à une hardiesse de vue étonnante, ont été parmi les meilleurs atouts de notre travail. Son dynamisme communicatif n'a cessé d'en être le moteur. La sérénité souriante qu'il sait opposer aux multiples difficultés de sa tâche nous a appris à vaincre les nôtres dans le même esprit et c'est à sa bienveillante compréhension que nous devons d'avoir pu concilier les exigences de la recherche et celles, si lourdes parfois, de l'enseignement. Qu'il veuille donc bien trouver ici l'expression de notre gratitude et de notre admiration.

Après cinq années d'interruption due aux événements, c'est par les cours si vivants et documentés de M. le Professeur Paul REMY que nous avons repris contact avec l'étude du monde animal. Nul, mieux que lui, n'aurait su nous faire partager l'intérêt passionné qu'il lui porte et nous inciter à travailler dans cette voie. De tout cœur, nous l'en remercions.

Dans les exposés magistraux de M. le Professeur Robert ECHEVIN, nous avons trouvé des modèles de méthode, d'ordre, de clarté. Nous avons fait de notre mieux pour nous en inspirer dans nos recherches et notre enseignement. Qu'il reçoive ici le témoignage de notre gratitude très sincère.

A M. le Professeur Pierre GRABAR, nous sommes profondément reconnaissant de la bienveillance avec laquelle il nous a accueilli dans son remarquable Laboratoire de l'Institut Pasteur de Paris pour nous initier à la technique dont il est l'inventeur. Malgré les nombreuses obligations qu'entraîne une notoriété désormais mondiale, il a bien voulu nous accorder un peu de son précieux temps et s'associer à notre jury. Sa présence est pour nous un honneur et une joie.

M. le Professeur Louis FAGE, Membre de l'Institut, a sans cesse accordé à nos travaux un intérêt bienveillant et a accepté d'en présenter les résultats à l'Académie des Sciences. Nous sommes heureux de lui exprimer ici notre respectueuse reconnaissance.

Nos remerciements très sincères vont encore à MM. les Professeurs Edgar LEDERER, de Paris, Paul BOULANGER, de Lille, et Jakob BAUER, de Munich, pour l'hospitalité cordiale qu'ils nous ont offerte dans leurs laboratoires respectifs.

Nous remercions de même M. le Doyen Paul MATHIAS, MM. les Professeurs Georges TEISSIER et Pierre DRACH qui nous ont permis plusieurs séjours fructueux dans les Stations biologiques de SÈTE et de ROSCOFF. Que les cadres scientifiques et le personnel technique de ces établissements, toujours si dévoués, se sentent pleinement associés à cet hommage.

M. le Docteur Marcel VERAÏN a mis très aimablement à notre disposition les puissants moyens de son Laboratoire de Biologie clinique, l'un des plus modernes et des mieux équipés de France. Avec une constante bienveillance, il nous a aussi assisté de sa longue expérience de Biologiste. Nous lui adressons l'expression de notre indéfectible attachement.

Enfin, notre profonde, notre chaleureuse sympathie va à nos Amis, Collègues et Collaborateurs de l'Institut de Biologie et de l'Ecole de Laiterie de Nancy. Tous ensemble, nous avons formé une équipe animée du meilleur esprit d'entraide et de camaraderie, créant une atmosphère cordiale dans laquelle le travail ne pouvait être que facile et agréable.

INTRODUCTION

Le milieu intérieur des Vertébrés, en particulier celui des Vertébrés supérieurs et de l'Homme, est relativement bien connu. Pour des raisons évidentes, d'innombrables recherches, poursuivies avec les moyens techniques les plus récents et les plus perfectionnés, se sont efforcées d'en établir la composition précise, ainsi que les variations physiologiques et pathologiques.

On ne peut en dire autant de la plupart des autres groupes zoologiques. Dans la classe des Crustacés, par exemple, nos connaissances en la matière demeurent restreintes et fragmentaires.

Pourtant, sans vouloir critiquer cette sorte « d'égoïsme biochimique » compréhensible et justifié, nous pensons qu'à bien des titres le liquide cavitair de ces animaux mérite une étude approfondie.

D'une part, elle est susceptible de compléter le tableau encore très partiel de notre connaissance biochimique du monde vivant, rendant ainsi possibles ou plus documentées des œuvres de synthèse comme celles qui ont trait à l'évolution biochimique.

Elle s'impose, d'autre part, pour l'éclaircissement de certains phénomènes physiologiques connus depuis fort longtemps dans ce groupe, mais jamais expliqués, et dont la compréhension serait susceptible de jeter des lumières nouvelles sur les grands problèmes de la croissance et de la sexualité.

Elle est enfin de nature à apporter des renseignements théoriques généraux sur la physico-chimie de substances comme les protéines et les complexes qu'elles forment avec les glucides et les lipides.

Dire que rien n'a été fait dans ce domaine serait injuste et inexact. En réalité, les travaux ne manquent pas, mais beaucoup d'entre eux sont anciens et n'ont donc pu profiter de techniques récemment acquises. D'autres s'adressent à telle ou telle substance en particulier, pour l'étudier en tant qu'entité chimique, indépendamment de son contexte vivant. Trop souvent aussi, ils sont réalisés à partir d'un nombre minime ou non précisé d'individus, sans aucune indication de l'état physiologique actuel, ce qui rétrécit beaucoup la validité des résultats.

De tels travaux méritaient donc d'être repris ou complétés.

Le but de nos recherches a été de contribuer à la connaissance biochimique de l'hémolymph du Crustacé Décapode *Carcinus maenas* Linné, matériel commun et d'élevage aisé, de manière à créer avec les éléments préexistants, une base de départ solide pour l'étude biochimique approfondie d'un problème redevenu très actuel : celui de la sexualité des Crustacés.

Pour être valable, l'investigation biochimique d'un organisme doit répondre à deux impératifs majeurs : la connaissance solide des principes et des techniques indispensables à l'identification et à l'évaluation des composants probables, mais aussi et surtout, une expérience très poussée de la biologie du groupe ou de l'espèce considérés.

Or, ces conditions sont loin d'être toujours réunies.

Il nous faut reconnaître que, très souvent, Zoologistes et Biologistes ont une admiration respectueuse et lointaine pour la biochimie et ses techniques d'avant-garde, alors que, non moins fréquemment, les Biochimistes exercent leur art sur des animaux dont ils ignorent le mode de vie.

Dans la mesure du possible, nous nous sommes efforcé d'éviter de tels écueils. Bien que Biologiste de formation, nous nous sommes attaché à acquérir pleinement la méthodologie de techniques biochimiques récentes en essayant de les perfectionner et même en créant un appareillage nouveau. D'un autre côté, de nombreuses années d'observations, d'élevage et d'expérimentation nous ont familiarisé avec la biologie de *Carcinus maenas*. Chaque fois que cela semblait utile, nous n'avons pas craint de répéter certaines analyses sur des milliers d'individus, afin d'éviter toute conclusion hâtive et de conférer plus de certitude à l'interprétation. Enfin, nous nous sommes efforcé de ne jamais oublier que nous avions à faire à un matériel vivant et que chaque élément que l'analyse pouvait en détacher artificiellement demandait à être replacé dans son contexte global avant de donner lieu à conclusions.

Un programme complet aurait exigé l'étude systématique de toutes les substances minérales et organiques pouvant se rencontrer chez l'animal choisi. Une telle œuvre est de longue haleine et aurait débordé du cadre de notre travail. C'est donc sciemment que nous avons cédé à la tentation de chercher par les voies les plus rapides la solution de problèmes déjà anciens, d'orienter nos essais dans des directions préférentielles, au détriment de certaines autres. Le plan de notre exposé ne se comprendra que dans cette perspective.

Après un chapitre préliminaire destiné à familiariser le lecteur non Naturaliste avec le matériel étudié, sa provenance, son mode d'élevage, sa biologie sommaire et les données biochimiques déjà acquises, nous aborderons l'étude des lipides dans le but de vérifier ou d'infirmer l'hypothèse de G. SMITH au sujet du rôle de ces substances dans le déterminisme des caractères sexuels des Crustacés.

Puis, nous rechercherons chez nos animaux des composés à configuration stéroïde, afin d'établir une fois pour toutes si leur différenciation sexuelle emprunte les mêmes voies et moyens que celle des Vertébrés. Ces recherches seront associées à divers essais d'injections d'hormones pures de Vertébrés et de liquides biologiques.

La dernière et plus grande partie de ce travail sera consacrée aux protéïdes qui ont connu notre faveur particulière pour leur importance primordiale dans l'édification des tissus et le rôle qu'ils jouent dans la réalisation de certains processus hormonaux chez les Vertébrés.

Le désir de trouver une solution au problème ancien de la « castration parasitaire » fera que, tout au long de nos analyses, on rencontrera le souci de rechercher des différences entre les Crabes indemnes et ceux qui sont parasités par la Sacculine.

Nous ne nourrissons pas l'illusion d'avoir épuisé l'un quelconque des problèmes abordés. Bien au contraire ! Sans même parler du chapitre des glucides délibérément réservé à des travaux ultérieurs, tous les résultats acquis et les progrès accomplis nous ont suggéré de nouvelles recherches à faire. Bien long sera encore le chemin à parcourir pour que le milieu intérieur des Crustacés soit aussi bien connu que celui des Vertébrés. Mais la petite partie que nous en avons explorée a suffi à nous le révéler comme une voie passionnante et pleine de promesses.

CHAPITRE PREMIER

LE MATÉRIEL ÉTUDIÉ

Nos recherches ont été effectuées sur *Carcinus maenas* Linné (1). Ce Crustacé Décapode Brachyoure, très commun sur nos côtes et bien connu sous le nom de « Crabe enragé », représente un matériel favorable à des études biochimiques. Il peut être récolté facilement, en grandes quantités, à peu de frais. La taille des individus moyens est suffisante pour fournir le volume d'hémolymphé nécessaire à l'analyse chimique, sans avoir recours à des microméthodes trop délicates. De plus, l'élevage en est relativement aisé et la biologie déjà bien connue.

Nous passerons successivement en revue la provenance des animaux dont nous nous sommes servi et les procédés employés pour leur élevage. Pour le lecteur uniquement Biochimiste, nous donnerons ensuite un bref aperçu de la biologie de *Carcinus maenas* et des problèmes qu'elle pose. Finalement, nous dresserons le tableau des données biochimiques déjà connues.

I. — PROVENANCE DES ANIMAUX

Les Crabes étudiés sont originaires des côtes de Bretagne (région de Roscoff) ou du littoral méditerranéen (Etang de Thau).

Entre les populations de ces deux régions, il existe des différences morphologiques et biologiques qui, après avoir été pressenties par A. VEILLET (1945), ont été démontrées avec précision par N. DEMEUSY (1958). Depuis, le Crabe méditerranéen a été dénommé *Carcinus mediterraneus* Czerniawski. Cependant, pour des raisons de simplification et jusqu'à ce que cette distinction soit devenue courante, nous continuerons à ne parler que de *Carcinus maenas* en précisant chaque fois son origine.

(1) *Carcinides* Rathbun (1897) = novum nomen pro *Carcinus* Leach (1814) nec Latreille. Le terme *Carcinus* a été conservé.

Dans nos essais, nous avons naturellement pris soin de traiter des lots homogènes d'animaux de même provenance, de manière à écarter l'influence possible d'un facteur spécifique. Lorsque cela n'a pas été le cas, ce sont des échantillons parallèles qui ont été examinés et comparés, avec le souci de révéler d'éventuelles divergences. Disons de suite que de telles différences n'ont, à aucun moment, pu être constatées.

Les recherches ont été effectuées, soit à l'Institut de Biologie de Nancy sur des Crabes expédiés et élevés en ce lieu, soit au cours de plusieurs séjours dans les Stations biologiques de Roscoff (1951, 1954, 1956) et de Sète (1950, 1955, 1956).

II. — TECHNIQUES D'ELEVAGE

Chaque fois que les recherches n'ont pas porté sur des animaux stockés en milieu conservateur, ou fraîchement pêchés, ou expédiés par les soins d'une Station, elles ont été faites sur des Crabes vivant en élevage.

Lorsque leur étude n'a pas exigé qu'ils soient suivis individuellement, ils ont été conservés vivants, en vrac, dans de grands bacs en ciment avec un minimum d'eau de mer et quelques algues humides. Dans le cas contraire, nous avons utilisé le dispositif d'élevage en boîtes de matière plastique mis au point par A. VEILLET et N. DEMEUSY (1951) et maintenant utilisé dans la plupart des laboratoires s'intéressant aux Crustacés.

A Nancy, nous nous sommes servi d'une installation d'eau de mer en circuit fermé, conçue par A. VEILLET et réalisée avec lui en collaboration avec l'équipe des Chercheurs du Laboratoire (N. DEMEUSY et R. LENEL). Cette installation fonctionne depuis près de dix ans et donne entière satisfaction. Nous ne reprendrons pas sa description détaillée déjà faite par N. DEMEUSY (1958), mais ajouterons quelques précisions supplémentaires.

L'eau de mer utilisée est de l'eau de mer naturelle, méditerranéenne, originaire de Sète où, en un lieu du littoral aussi peu souillé que possible, elle est pompée directement dans les containers métalliques qui serviront à l'acheminer par fer vers le lieu de destination. Malgré la distance appréciable (782 km) séparant Sète de Nancy, son prix de revient n'est guère supérieur à celui d'une eau de mer artificielle qui serait fabriquée sur place et qui ne présenterait pas les mêmes garanties biologiques.

La cuve en acier vitrifié dans laquelle était conservée cette eau initialement n'a pas résisté à l'action corrosive des sels. Elle a été remplacée par quatre cuves tronc-coniques, en bois, anciennes cuves de brasserie, d'une capacité individuelle de 30 hl environ. Superposées deux à deux, celles-ci peuvent être mises en circuit indépendamment et sont pourvues de trop-pleins. Les 120 hl qu'elles permettent de stocker suffisent, grâce au dispositif de filtration déjà décrit, à alimenter dans de bonnes conditions et pendant plus d'un an, environ 170 boîtes individuelles.

Pour réduire au minimum le temps perdu que représente la fastidieuse besogne du nettoyage des boîtes tous les deux jours, nous avons personnellement ajouté à l'installation un dispositif qui peut être recommandé à tous ceux qui pratiquent de tels élevages. Il comporte un tonnelet à eau distillée de 10 ou 20 litres dont la large ouverture supérieure est obturée par un bouchon de caoutchouc ou de liège à trois trous. Par l'un de ces orifices, le récipient est relié à une trompe à eau qui permet d'y créer une dépression réglable par l'intermédiaire d'un robinet assujéti au deuxième trou. La troisième percée porte un tube de verre relié à une canalisation de polyéthylène transparent de

10 mm de diamètre intérieur. Celle-ci est fixée au mur à 50 cm au-dessus du niveau des boîtes et court tout le long de l'installation. De mètre en mètre, cette conduite comporte un T en verre dont la branche asymétrique est coiffée d'un tuyau de polyéthylène assez souple d'une longueur de 120 cm environ. Chaque tuyau est porté par un bras métallique (50 cm) articulé au mur et mobile à 180° dans un plan horizontal. Cette mobilité permet à l'extrémité de chaque tuyau d'atteindre le fond des 32 boîtes de la batterie qu'il dessert. Ces extrémités sont obturées par de petits bouchons de caoutchouc que l'on enlève au moment de l'emploi. La tubulure inférieure du tonnelet est pourvue d'un robinet de vidange en verre. A la face inférieure du grand bouchon supérieur est suspendu, grâce à un disque en plexiglas, un sac filtrant en tissu imputrescible dans lequel pénètre l'extrémité de la canalisation.

L'ensemble de ce dispositif, dont une partie est représentée par la figure 1 ci-dessous fonctionne de la manière suivante.

Les robinets supérieur et inférieur du tonnelet étant fermés, on crée dans celui-ci une dépression à l'aide de la trompe à eau. On débouche ensuite rapidement l'extrémité du tuyau mobile correspondant à la batterie de boîtes que l'on veut nettoyer, pour la plonger aussitôt au fond de l'une d'elles que l'on parcourt alors en tous sens. Il se produit ainsi une aspiration vigoureuse de l'eau polluée, des débris et des excréments. Ces déchets, suffisamment ramollis par leur séjour dans l'eau, cheminent facilement dans la canalisation évacuatrice et se jettent dans le filtre du tonnelet qui en retient les fragments les plus gros. Lorsque l'une des boîtes est ainsi vidée et nettoyée, on passe sans interruption à la suivante, le rythme de vidange devenant de plus en plus rapide au fur et à mesure de l'accroissement de la dépression dans le tonnelet et du remplissage de celui-ci. Par ce procédé, le nettoyage se fait au moins deux ou trois fois plus vite et mieux qu'avec la poire aspirante utilisée par la plupart des chercheurs. Une fois le tonnelet rempli, il ne reste qu'à interrompre la dépression et à ouvrir le robinet inférieur pour que l'eau, déjà partiellement épurée, rejoigne les voies collectrices qui la conduiront au filtre à charbon activé et la feront ainsi rentrer dans le circuit général.

Ce système simple, propre, semi-automatique, permet de réaliser une économie de temps considérable. Nous le recommandons donc vivement pour toutes les installations d'élevage fixes du genre de celle que nous avons utilisée.

Sauf précisions particulières, les Crabes ont été nourris régulièrement tous les deux jours avec des Moules, des Crevettes grises ou roses ou des fragments de Poisson frais, ceci suivant les saisons.

Dans ces conditions, nous avons pu garder certains individus pendant près d'une année, les voyant muer normalement et obtenant la ponte des femelles.

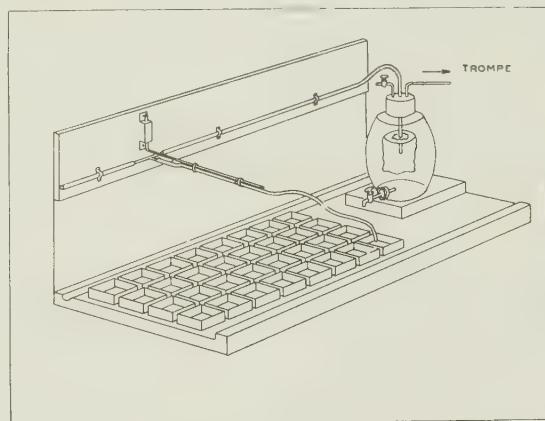


FIG. 1. — Dispositif de nettoyage semi-automatique pour installation d'élevage d'animaux aquatiques. Explications dans le texte.

III. — BIOLOGIE SOMMAIRE DE *CARCINUS MAENAS*

Le côté biochimique du présent travail étant susceptible d'intéresser des lecteurs non initiés à la biologie de l'animal étudié, nous pensons en faciliter la compréhension par une revue rapide des connaissances les plus récentes dans ce domaine.

A. — Développement et croissance.

1. *Ponte.*

Les œufs (200 000 environ) sont pondus par la femelle à une époque variable suivant les régions. A. VEILLET (1945) note que dans l'Etang de Thau les pontes s'échelonnent de la mi-novembre à mars, alors qu'il admet, à la suite de G. J. BROEKHUYSEN (1936) et J. H. ORTON (1936), qu'elles s'étalent sur toute l'année dans la région de Roscoff. Nous rapporterons plus loin nos observations personnelles à ce sujet.

Une fois pondus, les œufs, fixés aux soies des pléopodes, sont portés et incubés par la femelle entre l'abdomen et le céphalothorax. Ils sont aérés par l'agitation des pléopodes et brassés périodiquement par les pattes thoraciques.

2. *Développement.*

Le développement, d'abord intra-ovulaire, s'achève par une éclosion au stade zoé, première forme larvaire libre. A celle-ci succèdent des stades métazoé et mégaloïde dont les métamorphoses donnent les premiers stades Crabes habituellement désignés par des chiffres romains.

3. *Mues et croissance.*

Le passage d'un stade à l'autre, donc aussi la croissance des animaux, se font par le processus de la mue. Ce phénomène consiste en la formation, sous la carapace chitino-calcaire existante, d'un tégument nouveau et souple épousant les formes du précédent. Cette nouvelle enveloppe est mise à nu par l'exuviation, c'est-à-dire la sortie de l'animal tout entier de son ancienne carapace grâce à une fente qui se crée à la limite dorsale du céphalothorax et de l'abdomen.

Dans les heures qui suivent, le Crabe, d'abord flasque et sans ressort, absorbe de l'eau, augmente de taille et déplisse ses téguments. Ceux-ci durcissent progressivement par imprégnation minérale. L'animal arrive de la sorte à un stade de repos physiologique relatif dont il ne sortira que pour préparer la mue suivante.

Le phénomène de la mue est connu de longue date, mais il n'a été étudié avec précision que par P. DRACH (1939) qui a eu le mérite de relever pour la première fois un certain nombre de critères permettant de découper l'intervalle entre deux mues consécutives (cycle d'intermue) en des étapes définies et repérables. Comme nous serons amenés souvent à faire mention de ces subdivisions, il est utile de rappeler brièvement leurs caractéristiques chez *Carcinus maenas*.

Le cycle d'intermue de ce Décapode se partage en quatre grandes périodes A, B, C, D, elles-mêmes subdivisées. Les durées indiquées ci-dessous concernent des individus adultes de taille moyenne.

PERIODE A.

Etape A₁ : Durée = 10 - 15 heures.

Le Crabe vient de quitter son exuvie. La nouvelle carapace est molle et il ne peut se soulever sur ses pattes. L'aire gastrique est turgescence.

Etape A₂ : Durée = 20 - 40 heures.

La partie antérieure du bouclier dorsal acquiert une rigidité assez grande, contrairement aux aires branchiales et cardiaques qui restent souples. Tous les articles des pattes peuvent être pliés transversalement sans casser.

PERIODE B. — Durée = 2 - 3 jours.

Non subdivisée. Les aires branchiales et cardiaques conservent une souplesse diminuée. Seuls les méropodites peuvent être pliés sans cassure.

PERIODE C.

Etape C₁ : Durée = 4 - 8 jours.

Le bouclier dorsal est rigide, sauf l'aire cardiaque. Les branchiostégites sont encore flexibles dans leur région postérieure. Reprise de l'alimentation. Bien qu'ayant encore une certaine flexibilité, les pattes cassent au pli.

Etape C₂ : Durée = 7 - 15 jours.

Le bouclier dorsal est rigide, même dans l'aire cardiaque. Les branchiostégites ne sont plus guère flexibles que dans leur région postérieure et la souplesse des pattes persiste dans le sens normal à leur aplatissement.

Etape C₃ : Durée = 2 - 6 semaines.

Animal entièrement rigide et absence totale de couche membraneuse sur la face interne de la carapace.

Etape C₄ : Durée = plusieurs mois.

Développement progressif de la couche membraneuse.

PERIODE D.

Etape D₁ : Durée = 5 - 12 jours.

Les nouvelles soies en formation sont visibles au microscope sur l'épipodite branchial externe du maxillipède I ou encore sur les pléopodes des femelles. Une partie de la couche membraneuse se gélifie et un fragment découpé de la carapace se décolle aisément.

Etape D₂ : Durée = 6 - 12 jours.

Sécrétion d'une partie de la couche pigmentaire que l'on peut apercevoir par une ouverture découpée dans la carapace.

Etape D₃ : Durée = 2 - 5 jours.

Sous la pression de l'ongle, la carapace se brise aisément au niveau de la suture épimérienne.

Etape D₄ : Durée = 15 - 30 heures.

Résorption totale de l'exosquelette le long d'une partie de la ligne de déhiscence. L'animal est particulièrement apathique. Cette étape se termine par l'exuviation qui s'annonce par le soulèvement du bord postérieur du bouclier dorsal.

Ce système permet de déterminer le stade d'intermue des animaux en expérience sans avoir à les sacrifier. Cependant, comme nous l'avons laissé entendre, les durées indiquées ci-dessus n'ont qu'une valeur approximative et ne peuvent être étendues à la totalité des individus. En effet, les Crabes jeunes muent beaucoup plus vite, à des intervalles qui se chiffrent d'abord en jours, puis en semaines. A. VEILLET (1945) a calculé, pour *Carcinus maenas*, que ce n'est qu'à partir d'une taille de 25 à 30 mm que l'intermue dépasse le mois.

Si nous avons tenu à bien repréciser ce phénomène, c'est que son importance est capitale pour des études biochimiques. En effet, dans un cycle d'intermue, les transformations morphologiques sont accompagnées, comme l'a montré L. RENAUD (1949), d'un bouleversement métabolique qui affecte de nombreux composants minéraux et organiques du liquide cavitare. Or, trop souvent, les analyses chimiques antérieures ont été faites sans tenir compte de ce facteur ou sans donner de précisions à son sujet. Leur validité s'en trouve beaucoup diminuée.

Le déterminisme de la mue est partiellement connu depuis la découverte par M. GABE (1953) et l'étude physiologique par G. ECHALIER (1954, 1955) des glandes qui en sont responsables. Ces glandes de mue, encore dénommées organes Y, sont paires et situées ventralement dans la région antérieure du céphalothorax. Leur ablation chirurgicale entraîne l'arrêt des mues, alors que leur implantation chez des Crabes déjà bloqués les fait réapparaître. Fait remarquable et unique chez les Arthropodes, l'hormone de mue a été isolée à l'état cristallisé par A. BUTENANDT et P. KARLSON (1954), d'abord chez les Insectes, puis, par P. KARLSON (1956), chez les Crustacés. Il s'agit, en fait, de deux substances appelées ecdysone α et β , qui sont l'une et l'autre actives dans ces deux classes animales.

Nous évoquerons par la suite les relations entre les organes Y et les autres glandes endocrines de *Carcinus*.

A chaque exuviation, le Crabe augmente de taille et les renseignements les plus récents à ce sujet sont de A. VEILLET (1945) qui calcule que le taux de croissance est d'environ 30 %, qu'il reste pratiquement constant durant toute la vie de l'animal, exception faite d'une légère diminution propre aux Crabes de plus de 40 mm de long.

B. — Sexualité.

1. Ses manifestations.

Chez *Carcinus maenas*, les sexes sont séparés et un dimorphisme sexuel accentué porte à la fois sur les gonades, le tractus génital et certains caractères morphologiques externes. Pour ces derniers, des différences importantes affectent la forme, l'ornementation, la taille et les appendices du céphalothorax. D'autres concernant la forme, la pigmentation, la segmentation et les appendices de l'abdomen. A. VEILLET (1945) a étudié en détail l'apparition progressive de ces divergences qui, nulles au stade I, se développent peu à peu et d'une manière variable pour chaque caractère. Les animaux passent ainsi par un stade juvénile auquel succède, après une mue dite de puberté et étudiée en détail par N. DEMEUSY (1958), un état adulte nettement différencié dans les deux sexes.

L'accouplement des adultes a lieu après une mue de la femelle, alors que celle-ci est encore molle.

2. Son déterminisme.

La connaissance du déterminisme des caractères sexuels ♂ chez les Crustacés a été admirablement éclairée par la découverte, en 1954, par H. CHARNIAUX-COTTON, de glandes androgènes chez *Orchestia gammarella* Pallas. Ces formations glandulaires ont été retrouvées chez *Carcinus maenas*, accolées à la région subterminale des spermiductes.

L'expérimentation sur *Orchestia gammarella* a montré que ces glandes sont responsables de la différenciation des caractères sexuels primaires et secondaires ♂. Leur ablation oriente la régénération des variants sexuels ♂ dans le sens ♀. Leur implantation chez des femelles entraîne une masculinisation complète de ces dernières.

Cette découverte est d'autant plus remarquable que, pour la première fois, elle met en évidence la production de substances androgènes par une glande sexuelle entièrement séparée des testicules. Elle sera définitivement couronnée le jour où on parviendra à isoler l'hormone ou les hormones sécrétées. Nous verrons par la suite les quelques tentatives que nous avons faites dans ce sens.

Le déterminisme des caractères sexuels ♀ est beaucoup moins connu. La question se complique du fait que dans ce sexe il faut distinguer deux sortes de caractères sexuels secondaires : d'une part, ceux qui sont temporaires, liés à l'incubation et dont on pense qu'ils sont contrôlés par l'ovaire en vitellogenèse ; d'autre part, ceux qui sont permanents, certains d'entre eux pouvant être liés à une hormone ovarienne, les autres paraissant indépendants des gonades. La localisation précise des cellules d'origine de ces substances reste à faire, tout autant que leur séparation analytique. Il y a là un champ d'exploration à la fois immense et vierge.

C. — Corrélations hormonales.

On connaît actuellement chez *Carcinus maenas* et les Crustacés Décapodes en général trois complexes glandulaires endocrines.

Le premier se situe dans les pédoncules oculaires où existent deux glandes essentielles : l'organe X et la glande du sinus (B. HANSTRÖM, 1939). Les très nombreux travaux qui ont suivi leur découverte ont montré que ces glandes agissaient sur des processus physiologiques aussi variés que la pigmentation, la croissance, la longévité, les rythmes nycthémeraux, le métabolisme hydrique, celui du calcium, la respiration, l'activité motrice, les fonctions diabétique et tyrosinasiques, la mue.

Le second est celui des organes Y déjà mentionnés et qui commandent le phénomène de la mue.

Les glandes androgènes constituent le troisième groupe dont l'étude est en plein développement.

Entre ces différents organes sécréteurs existent des relations qui ne sont pas encore bien élucidées. Elles donnent lieu à d'intéressantes recherches dont les résultats sont d'ailleurs parfois contradictoires et variables suivant les espèces. On sait que les glandes du pédoncule oculaire agissent sur la mue et on suppose l'existence d'une hormone accélératrice et d'une hormone inhibitrice. On peut admettre que cette action s'exerce par l'intermédiaire des glandes Y. On a également observé une action inhibitrice des pédoncules oculaires sur le développement et la maturation des ovaires, la fréquence des pontes. Les glandes de mue semblent, elles aussi, agir sur les glandes génitales, mais alors que L. ARVY, G. ECHALIER et M. GABE (1956) leur prêtent un effet stimulant, N. DEMEUSY (1959) observe une influence opposée.

Les formations endocrines du pédoncule oculaire exercent encore leur action sur les glandes androgènes qui s'hypertrophient après leur ablation (N. DEMEUSY, 1958), sans que l'on sache si cette hypertrophie est fonctionnelle ou dégénérative.

Cet aperçu très sommaire donne une idée de la complexité des relations d'interdépendance entre ces différentes glandes et montre que les rouages précis de ces mécanismes sont loin d'être connus. Il est probable que l'on soit en présence d'un complexe hormonal du genre de celui que commande l'hypophyse des Vertébrés. Si l'on pense, qu'à part l'ecdysone, aucune des nombreuses hormones supposées n'a été jusqu'à présent identifiée ou isolée, on conçoit qu'il reste là un champ d'investigation prometteur pour les Biochimistes.

D. — Parasitisme du Crabe par la Sacculine.

Pendant longtemps, devant l'insuccès des castrations chirurgicales qui avaient été si fécondes chez les Vertébrés, on a tenté d'étudier le déterminisme sexuel des Crustacés par le biais de ce que, à tort d'ailleurs, on a appelé « la castration parasitaire ».

Toute une partie de ce travail gravitant autour de ce phénomène, rappelons brièvement en quoi il consiste.

1. Description du phénomène.

Le Crabe *Carcinus maenas*, comme d'autres espèces d'ailleurs, peut être parasité par le Crustacé Rhizocéphale *Sacculina carcini*. Thompson. Après quatre mues, les nauplii de ce Cirripède se transforment en larves cypris qui se fixent à la base des soies d'un Crabe venant de muer, se métamorphosent rapidement et, grâce à un trocart, injectent leur masse organique transformée dans le corps de l'hôte. Charriées par le milieu intérieur, les cellules injectées émigrent vers la région ventrale pour y donner les premiers stades internes de la Sacculine. Cette sorte de « tumeur » évolue en un « nucléus » qui est lui-même l'ébauche du sac viscéral, lequel, après avoir percé la paroi abdominale, devient externe et constitue l'excroissance ovoïde jaune ou violette caractéristique des Crabes sacculinés. Cette partie visible se prolonge à l'intérieur de l'hôte par un système de « racines » qui s'insinue entre les organes et par l'intermédiaire duquel la Sacculine puise dans le liquide cavitaire les éléments nécessaires à sa subsistance et à son développement.

Du point de vue sexuel, la Sacculine est hermaphrodite et comporte deux ovaires et deux testicules situés dans la masse viscérale. Les ovules sont pondus dans la cavité palléale pour y être fécondés par les spermatozoïdes, puis incubés jusqu'à leur éclosion et leur émission dans l'eau de mer environnante. Ces pontes se succèdent à un rythme assez rapide et il est probable que, dans un organisme parasitaire régressé comme celui de la Sacculine, leur élaboration représente l'essentiel des besoins énergétiques de l'animal, donc l'essentiel aussi des substances nutritives soustraites à l'hôte.

Si parmi les innombrables cas de parasitisme, celui du Crabe par la Sacculine est devenu l'un des plus connus, c'est que ses répercussions sur l'hôte sont intéressantes et variées. Les unes concernent la mue et la croissance du Crabe ; les autres sa sexualité.

2. Action sur la mue et la croissance.

Tant que le parasite est interne, son développement ne soustrait à l'hôte que des quantités relativement réduites d'éléments nutritifs. Les mues se poursuivent, même si, comme le suppose G. SMITH (1906), elles sont plus espacées. Il est probable aussi qu'au début de cette période le taux de croissance ne soit que peu réduit, mais il n'en est plus de même lorsque le parasite devient externe, développe la masse considérable du sac viscéral et édifie à un rythme accéléré des pontes volumineuses. Les mues se trouvent alors supprimées, non seulement pour des raisons mécaniques, mais surtout parce que le métabolisme du Crabe est perturbé au point de ne même plus préparer l'exuviation. Jusqu'à présent, il était communément admis que c'était là un effet de l'épuisement de l'hôte, mais, depuis la découverte des glandes de mue, on est en droit de se demander s'il ne s'agit pas d'une perturbation hormonale, soit que les racines de la Sacculine endommagent les organes Y, soit qu'elles soustraient du milieu intérieur l'hormone sécrétée par eux ou simplement un intermédiaire chimique ou enzymatique indispensable à sa formation. La première hypothèse n'est plus guère défendable depuis que A. VEILLET (1955), observant une centaine d'individus parasités, a constaté que les racines de la Sacculine ne pénètrent qu'exceptionnellement dans le corps même de ces glandes. A l'appui de la seconde, il n'existe encore aucun argument expérimental. Toute une étude reste donc à faire pour trancher la question.

En ce qui concerne le taux de croissance des Crabes, A. VEILLET (1945) a calculé qu'il diminue lors des mues précédant l'évagination du sac viscéral et que sa valeur tombe alors de 30 à 10 %.

3. Action sur la sexualité.

C'est dans ce domaine que l'action de la Sacculine reste la plus spectaculaire et, avouons-le, la plus inexplicée. Pourtant, les faits sont connus depuis fort longtemps.

Après avoir été étudiés en 1887 par A. GIARD, ils ont été réexaminés de nombreuses fois par la suite. Une bibliographie détaillée de la question est donnée par A. VEILLET (1945). Malgré tous les efforts qui ont aussi porté sur des espèces différentes, la causalité réelle du phénomène reste inconnue.

Quels sont les faits ?

a) Chez les mâles.

Les mâles, sur lesquels la Sacculine a eu le temps d'agir longuement, sont féminisés dans la plupart de leurs caractères sexuels. Ces modifications affectent le céphalothorax aussi bien dans sa forme générale que dans ses détails ornementaux. On voit même apparaître, face ventrale, les orifices génitaux ♀ au niveau du VI^e segment thoracique. Souvent, les pinces sont réduites par rapport à celles des mâles normaux. L'abdomen triangulaire s'élargit, s'arrondit pour acquérir un aspect femelle typique. A. VEILLET (1945) a concrétisé et rendu mesurables ces transformations en étudiant les variations du rapport R du III^e segment abdominal au V^e (fig. 2, page 16). Normalement de 4,6 chez le mâle indemne et de 4,1 chez la femelle, ce rapport s'abaisse à 4,1 ou même 4,02 chez les mâles les plus féminisés. De plus, les segments abdominaux III, IV et V, soudés chez le mâle et articulés chez la femelle, acquièrent rapidement cette dernière disposition chez les mâles parasités.

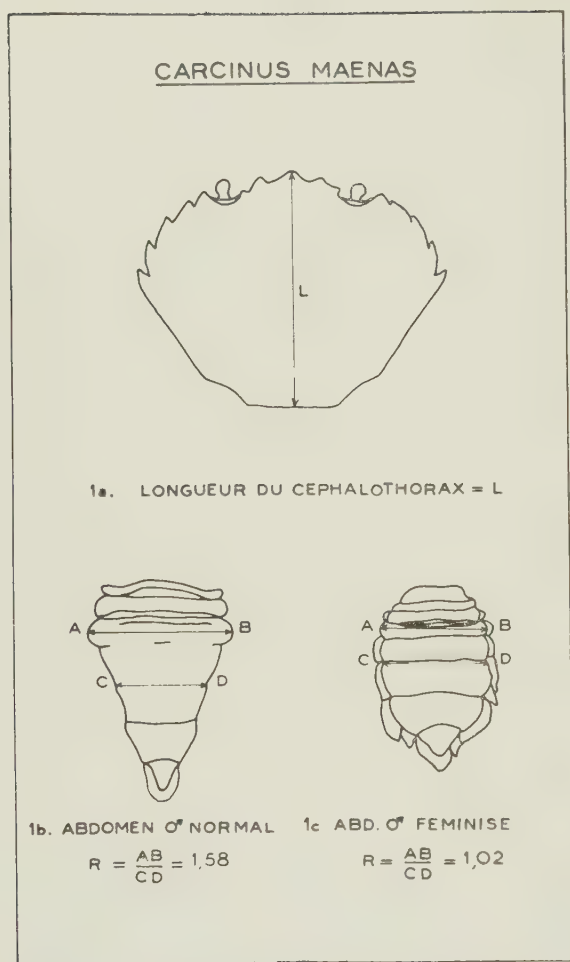


FIG. 2. — Données biométriques de la carapace de *Carcinus maenas*.

Les pléopodes aussi subissent des transformations profondes qui tendent à les rapprocher du type femelle. On assiste même à l'apparition d'appendices supplémentaires comparables, dans une certaine mesure, à des pléopodes ♀ typiques.

Les mâles ainsi atteints perdent encore leur humeur combattive, leur instinct sexuel s'affaiblit et ils deviennent inaptes à la reproduction.

Remarquons toutefois que ces modifications n'apparaissent pas d'emblée, qu'elles s'accroissent à chaque mue, si bien que les animaux les plus féminisés sont généralement ceux qui ont pu muer le plus souvent avant la sortie de la Sacculine. Elles se manifestent aussi dans un certain ordre qui est inverse de celui de leur différenciation.

Les gonades elles-mêmes n'échappent pas à l'action du parasite. Chez les Crabes atteints de longue date, les testicules sont réduits, mais la spermatogenèse persiste toujours et, contrairement à ce qui se passe dans les genres *Inachus* et *Eriocheir*, jamais on n'a signalé d'ovo-testis ou d'ovaires chez *Carcinus maenas* ♂. Ajoutons enfin que les canaux déférents subissent quelquefois des altérations mélaniques.

b) Chez les femelles.

Bien que leur intérêt soit moindre, mentionnons l'existence de transformations chez les femelles envahies par la Sacculine. A. VEILLET (1945) a bien attiré l'attention sur le fait que leur abdomen s'élargit plus et plus rapidement que celui des femelles indemnes juvéniles et qu'il peut devenir plus large que celui des femelles normales. L'indice de féminisation s'abaisse dans certains cas à des valeurs inférieures à un

Cet élargissement s'accompagne chez les femelles impubères de quelques autres modifications : l'abdomen se creuse en auge, se décroche du céphalothorax, se borde de soies et se pigmente suivant le type ♀ adulte. A taille égale, on observe aussi une réduction des pléopodes chez les individus parasités.

Au début du parasitisme, l'ovogenèse n'est pas inhibée, mais l'accumulation du vitellus dans les ovules ralentit et la vitellogenèse cesse lorsque la Sacculine devient adulte et édifie ses propres pontes.

Ainsi donc, la présence d'une Sacculine implantée dans l'organisme d'un Crabe, y plongeant ses racines et y puisant sa nourriture, a un retentissement considérable sur la morphologie et la physiologie de l'hôte. Elle aboutit à cette transformation étonnante qu'est la féminisation presque totale des attributs sexuels ♂. Il n'est pas surprenant que, très tôt, celle-ci ait frappé et intrigué les Naturalistes et qu'aussitôt ils en aient cherché l'explication.

4. Interprétations du phénomène.

La première interprétation qui se présente à l'esprit se base sur la constatation d'une réduction des gonades chez les sujets parasités. Elle consiste à supposer une relation de cause à effet entre cette atrophie et les modifications des caractères sexuels externes. C'est elle qui a amené A. GIARD (1887) à parler de « castration parasitaire » et à nous léguer cette locution très expressive, mais non fondée. En effet, il arrive fréquemment que des Crabes ♂ soient très féminisés sans que pour autant leurs testicules soient altérés. Néanmoins, des auteurs comme A. LIPSCHÜTZ (1924), G. J. Van OORDT (1928), A. BRINKMANN (1936) croient observer des corrélations entre le degré de transformation des espèces qu'ils étudient et l'état de leurs gonades. De manière plus ou moins nuancée, ils se rattachent donc à la tendance de GIARD.

Une deuxième tentative d'explication est fournie par G. SMITH (1910, 1911, 1913) qui voit l'origine des modifications sexuelles consécutives au parasitisme dans une perturbation du métabolisme lipidique des Crabes. Ces vues sont partagées par G. C. ROBSON (1911), B. W. TUCKER (1930), T. E. HUGHES (1940). L'examen de cette hypothèse fera l'objet de tout un chapitre de ce travail et nous montrerons alors qu'elle ne peut se justifier.

Ne retenons que pour mémoire une théorie contemporaine de celle de G. SMITH émise par A. BIEDL (1913) qui, méconnaissant totalement l'hermaphrodisme de la Sacculine, la suppose femelle et lui fait sécréter une hormone féminisante diffusée dans le sang de l'hôte.

Beaucoup plus clairvoyantes sont les vues de R. COURRIER (1921) qui, observant avec justesse l'absence de corrélation entre le degré de féminisation des caractères sexuels et celui de l'altération des gonades, suggère que, si l'action de la Sacculine s'exerce par l'intermédiaire d'une glande, celle-ci ne peut qu'être indépendante des testicules. L. FAGE (1940) exprime à propos des Lophogastrides une opinion semblable. La découverte ultérieure de la glande androgène par H. CHARNIAUX-COTTON (1954) a montré combien cette supposition est justifiée. Signalons encore que les observations de R. COURRIER chez *Carcinus maenas* sont confirmées en 1935 par Y. K. OKADA et Y. MIYASHITA travaillant sur *Eriocheir japonicus* de Haan.

Une autre tendance interprétative est celle dirigée par R. GOLDSCHMIDT (1931) et reprise par G. REVERBERI (1944 - 1945) et E. G. REINHARD (1956). D'après elle, la féminisation parasitaire des Crustacés ♂ doit être considérée comme un cas d'intersexualité dû à l'action perturbatrice du parasite sur la réalisation des potentiels génétiques ♂ et ♀. Dès 1940, H. G. CALLAN a adopté des vues analogues, admettant de plus que les différentes espèces de Crustacés sont inégalement sensibles à cette perturbation, certaines d'entre elles étant sexuellement très stables et d'autres très fragiles.

Terminons cet aperçu en rapportant les opinions que A. VEILLET (1945) émet dans son étude approfondie du parasitisme des Crabes de l'Etang de Thau :

« Au moment de la fécondation, le sexe est déterminé. A partir de ce moment les caractères sexuels évoluent suivant un plan fixé à l'avance, chaque caractère étant commun aux deux sexes pendant un certain temps, puis se différenciant à partir d'un point de virage déterminé. Dans chaque territoire commun, la réaction physico-chimique change à ce point de virage, à cause de la composition chromosomique des cellules de ce territoire. Elle est indépendante du milieu interne ♂ ou ♀... A partir du moment où la cypris ou la larve cryptoniscienne se fixe, les caractères sont modifiés à distance, indépendamment de l'état des gonades, dans l'ordre inverse de leur différenciation et quel que soit le parasite. C'est que les réactions qui dirigent le développement de chaque caractère sexuel sont déviées du côté ♀ et même accélérées de la même façon dans les deux sexes (cas de l'élargissement de l'abdomen). Ces réactions sont influencées sur place par l'intermédiaire du milieu intérieur. Ce dernier, modifié par le parasitisme, a les mêmes effets qu'un changement de constitution chromosomique... ».

Comme on le constate, cette hypothèse fait une synthèse entre les théories génétique et métabolique sans faire appel à une substance sexuelle précise. Elle constitue donc une étape supplémentaire, mais non définitive sur le chemin qui doit mener à l'explication intégrale du mécanisme de la détermination du sexe chez les Crustacés.

Cette brève vue d'ensemble montre que beaucoup des théories émises font appel à un intermédiaire métabolique. De ce fait, elles ont été à l'origine d'une grande partie des recherches biochimiques déjà effectuées sur les Crabes et l'on peut dire qu'une part appréciable des connaissances que nous avons du milieu intérieur de ces animaux leur est due. Avant d'exposer notre propre contribution à cette étude, faisons un rapide bilan des données biochimiques antérieurement acquises au sujet du liquide cavitaire de *Carcinus maenas*.

IV. — CONNAISSANCE BIOCHIMIQUE ANTERIEURE DE L'HEMOLYMPHE DES CRABES NORMAUX ET SACCULINES

L'un des premiers mémoires concernant la biochimie du milieu intérieur des Crustacés est celui de F. HEIM (1892). Son ancienneté limite son intérêt aux observations macroscopiques qu'il renferme plus qu'à son côté analytique.

Dès le début du siècle par contre, L. BRUNTZ et J. GAUTRELET (1902) essaient de comparer chimiquement la composition de l'hémolymphe du Crabe et celle de la Sacculine. Ils trouvent que les teneurs en chlorures, calculées en NaCl, sont identiques chez l'hôte et chez le parasite (30 g/l), et légèrement inférieures à celle de l'eau de mer. Cette identité existe aussi pour les phosphates, calculés en PO_4H_3 , et elle s'étend ici à l'eau de mer (0,150 g/l). Par contre, le milieu intérieur de la Sacculine serait plus acide que celui du Crabe. Les auteurs signalent aussi la présence d'une quantité notable d'acide lactique chez la Sacculine et y supposent l'existence de méthylamine.

M. KOLLMANN (1909) s'intéresse plus spécialement aux éléments figurés du liquide cavitaire et constate à ce propos que le parasite inhibe le développement de certains leucocytes granuleux du Crabe.

Un peu plus tard, de 1910 à 1913, G. SMITH entreprend les premières recherches quantitatives concernant les acides gras du sang de *Carcinus maenas*. Nous ferons leur analyse détaillée dans le chapitre qui leur est consacré spécialement.

A la même époque, dans le cadre d'une étude générale de l'immunité chez les Invertébrés, J. CANTACUZÈNE (1912) recherche les effets éventuels de la Sacculine sur les propriétés immunologiques de l'hémolymphe de son hôte. Ses expériences l'amènent à conclure que celle-ci acquiert, chez le Crabe parasité, des propriétés nouvelles vis-à-vis des tissus du Rhizocéphale ou des produits de son métabolisme.

Inspiré par ces travaux, R. LÉVY tente, en 1923, de mettre en évidence les propriétés toxiques des tissus de la Sacculine. Par des injections d'extraits, il montre que ces tissus sont mortels pour le Crabe à partir d'une certaine dose qui est variable suivant les organes employés. On peut évidemment se demander si l'action observée n'est pas due au mode de préparation des extraits (altération des protéines par exemple) ou à une réaction immunologique contre l'injection de trop fortes doses de protéines étrangères. Quelques essais sont précisément réalisés par l'auteur pour déceler une réaction d'immunité chez les Crabes parasités, mais leurs résultats sont peu concluants et ne permettent pas de dire si les Crabes parasités ou guéris sont moins sensibles aux injections que les individus normaux.

L'année suivante, le même auteur cherche à mettre au point un séro-diagnostic qui permette d'identifier les Crabes sacculinés. Il constate que l'addition progressive d'une solution étendue de NaOH au sérum dilué d'un Crabe parasité provoque un trouble qui ne se dissout pas dans un excès de réactif. Ce trouble est beaucoup plus faible chez les individus indemnes. Un résultat analogue est obtenu par addition d'acide, avec cette différence que le précipité observé se redissout dans un excès de réactif. La redissolution est toutefois plus rapide pour les Crabes sacculinés. Le test, appliqué à un premier lot d'animaux, a paru concluant à l'auteur, alors que des lots ultérieurs n'ont fourni que des résultats désordonnés qui sont imputés à des variations saisonnières des propriétés de l'hémolymphe.

A la lumière des connaissances acquises et de celles qu'apportera le présent travail, nous pensons que ce « séro-diagnostic » n'est autre chose que le reflet des modifications salines ou organiques subies par l'hémolymphe des Crabes sous l'influence du parasite. On peut supposer par exemple que l'acidification provoque tout simplement la précipitation de protéines, et comme celles-ci sont souvent, nous le verrons par la suite, moins abondantes chez les animaux épuisés par la Sacculine, leur redissolution est plus rapide.

C'est encore le travail de J. CANTACUZÈNE qui a inspiré celui de A. DAMBVICEAU (1929). En rassemblant une importante documentation préliminaire, cet auteur essaie de rendre possible la poursuite de recherches approfondies sur l'immunité des Décapodes. Il s'efforce d'établir les constantes chimiques du plasma de nombreux Crustacés à l'état normal et en cours d'immunisation. De ces multiples données, nous ne retiendrons que celles qui concernent *Carcinus maenas* et sont donc en rapport direct avec nos propres travaux. Nous en discuterons de façon détaillée dans le chapitre réservé aux protéines.

Le même souci de préciser la composition chimique de l'hémolymphe de *Carcinus maenas* et de la comparer chez les animaux normaux et parasités, se retrouve chez A. DRILHON et E. A. PORA (1936). Mais ces auteurs s'intéressent surtout aux substances minérales, bien qu'ils signalent aussi une nette augmentation et des variations qualitatives des protéines chez les Crabes parasités. D'après leurs recherches, le taux des alcalins reste équivalent dans les deux groupes, alors que celui des alcalino-terreux est plus que doublé chez les animaux sacculinés. Cette constatation pourrait expliquer le trouble observé par R. LÉVY lors de l'addition de NaOH à l'hémolymphe. Des déterminations analogues

ont été faites sur des fragments musculaires de Crabes indemnes et parasités, de même que sur des tissus de Sacculine. Dans l'ensemble, les résultats obtenus vont dans le même sens que les précédents, mais il est impossible de dire s'ils sont statistiquement significatifs. Notons encore que la réserve alcaline serait nettement plus importante chez les Crabes sacculinés dont le milieu intérieur, contrairement à ce que pourrait suggérer l'abondance des alcalino-terreux, n'est que faiblement tamponné. La teneur en CO_2 libre serait, elle, doublée par rapport aux individus indemnes. Des différences ont également été relevées pour le pH du liquide cavitair. Celui des Crabes normaux serait moins acide ($\text{pH} = 7,42$) que celui des Crabes parasités ($\text{pH} = 7,17$). De l'ensemble de ces observations, les auteurs concluent que « tout se passe comme si l'hémolymphe des Crabes parasités était en perpétuel état d'avant-mue, état transitoire dans la vie normale, mais que le parasitisme rendrait ici permanent ».

Les travaux que nous venons de résumer représentent l'essentiel des recherches biochimiques faites sur l'hémolymphe de *Carcinus maenas*, du moins dans le domaine qui nous préoccupe. Comme on a pu le constater, ils se placent très souvent dans la perspective du problème du parasitisme par *Sacculina carcini*. Il existe encore quelques autres données éparses dans la littérature, notamment au sujet des glucides, mais elles sont isolées, ne concernent souvent qu'une substance déterminée et n'ont, la plupart du temps, été établies que pour les besoins de la physiologie comparée.

Evoquer les recherches faites sur des espèces autres que celle qui fait le sujet de ce travail serait long et déborderait le cadre que nous nous sommes fixé. Au cours des chapitres qui vont suivre, nous nous contenterons de faire appel à elles chaque fois qu'elles pourront apporter quelque lumière à notre sujet.

CHAPITRE II

ÉTUDE DES LIPIDES CHEZ *CARCINUS MAENAS* INDEMNE ET SACCULINE

Parmi les théories évoquées plus haut et tendant à expliquer le phénomène de la « castration parasitaire », celle émise par G. SMITH est restée l'une des plus accréditées. Jamais elle n'a été véritablement réfutée.

L'objet de ce chapitre est de la soumettre à un examen critique qui conduira à rejeter ses conclusions.

I. — L'HYPOTHESE DE G. SMITH

A. — Sa genèse.

Pour être bien jugée, l'hypothèse de SMITH demande à être replacée dans le cadre de son époque, c'est-à-dire au début de ce siècle.

Les lois de Gregor MENDEL viennent à peine d'être redécouvertes par DE VRIES, CORRENS et TSCHERMAK que déjà l'on tente d'appliquer les notions consécutives de ségrégation, allélomorphisme, hétérozygotisme, au problème de la détermination du sexe. Plusieurs théories d'obédience mendélienne voient le jour, notamment celle de Mac CLUNG (1902) et celle de CASTLE (1903). Ce dernier, par exemple, explique la sexualité en admettant, dans une généralisation abusive, que, dans tous les cas, chaque sexe est génétiquement un hybride sexuel (hétérozygote) de composition ♂ et ♀, le caractère ♂ dominant chez les mâles, le caractère ♀ dominant chez les femelles. Dans chaque sexe, les caractères du sexe opposé sont ainsi latents et leur apparition accidentelle n'est que la suite d'une défection des gonades.

SMITH ne peut admettre cette théorie, non seulement parce qu'elle met en jeu des mécanismes compliqués et non démontrés comme la fécondation sélective, mais aussi parce qu'elle est contraire à ses propres observations chez les Crustacés.

En effet, l'examen de milliers d'*Inachus mauritanicus* Lucas parasités par *Sacculina neglecta* (*Drepanorchis neglecta* Fraisse) lui a montré que les hôtes ♂ sont susceptibles d'acquérir tous les caractères sexuels externes ♀, que dans certains cas les testicules transformés vont jusqu'à produire des ovules, alors que les femelles atteintes ne manifestent à aucun moment, même lorsque sous l'action du parasite les ovaires ont complètement disparu, la moindre évolution dans le sens ♂. Ces constatations, alliées à des observations analogues chez d'autres espèces, amènent l'auteur à conclure que « du moins dans ces « formes, le mâle est potentiellement hermaphrodite, alors que la femelle est femelle « pure ». Ainsi, les mâles d'*Inachus* et de nombreuses autres espèces, mais non de toutes, seraient de constitution hermaphrodite. Ils ne manifesteraient normalement que leurs caractères ♂, mais pourraient être amenés, par suite de la perturbation parasitaire, à dévoiler leur potentiel ♀.

Le développement logique de ces suppositions conduit tout naturellement l'auteur à rechercher des précisions sur les conditions physiologiques qui font que le sexe masculin arrive à prendre le dessus pour devenir apparent.

Un deuxième problème, d'ailleurs très voisin, oriente ses recherches dans la même direction : c'est celui des corrélations entre caractères sexuels primaires et secondaires. Là encore, ses observations personnelles l'amènent à réagir contre des théories qui commencent à s'implanter à l'époque et qui veulent, d'une manière un peu simpliste, que la totalité des caractères sexuels secondaires dépendent de manière directe et intégrale de la présence fonctionnelle des caractères primaires correspondants. Or, cette assertion est en contradiction formelle avec les faits relevés chez *Inachus*. Ce matériel est un sujet d'étude fort probant, car le dimorphisme sexuel y est très accusé et très sensible à l'action du parasite. L'altération des caractères ♂ y va jusqu'à un hermaphrodisme complet, externe et interne, avec élaboration simultanée de spermatozoïdes et d'ovules. De tels bouleversements ne peuvent se faire par retour à un état intermédiaire non différencié, mais positivement, par l'acquisition de caractères n'apparaissant que chez la femelle mûre.

Ces considérations permettent à G. SMITH de souligner que, si l'on veut expliquer le développement des caractères sexuels secondaires femelles par l'action d'une substance sécrétée par les ovaires, cette interprétation perd toute validité pour les *Inachus* ♂ parasités puisque ceux-ci développent des caractères ♀ avant toute apparition d'ovaire et que certains d'entre eux conservent la possibilité d'édifier des gonades ♀ après dégénérescence des testicules, à partir de résidus d'épithélium germinatif apparemment indifférenciés. D'après SMITH, cette aptitude potentielle des ovaires doit donc exister chez les mâles et c'est elle qui leur permet d'acquérir des caractères externes femelles avant l'apparition des gonades de ce sexe. Ces caractères sexuels secondaires seraient donc indépendants des gonades, mais caractères et gonades dépendraient ensemble d'un troisième facteur inconnu.

C'est à ce troisième facteur hypothétique que SMITH essaie de donner consistance en l'imaginant tout d'abord sous forme d'une sécrétion interne circulant dans le corps et en lui donnant le nom de « sexual formative substance ». Une variété en serait mâle et l'autre femelle.

Mais les difficultés soulevées par l'application pure et simple de cette théorie amènent bientôt son auteur à la nuancer en supposant que la substance sexuelle formative n'est

pas une entité simple, mais se compose de substances différentes en continuuel remaniement pendant le développement de l'animal et susceptibles d'être modifiées par les gonades.

Sans aller plus avant dans le détail de ces spéculations, qu'il nous suffise de retenir que ce sont elles qui ont amené SMITH à rechercher dans l'hémolymph des Crustacés des substances sexuelles. C'est là le point de départ de toute l'étude biochimique qu'il entreprend avec G. C. ROBSON (1911) dans les Stations biologiques de Naples et de Plymouth.

B. — Ses fondements.

Se référant aux observations antérieures de F. HEIM (1892) qui note qu'au moment de la vitellogenèse l'hémolymph des Crabes ♀, se charge « d'un lipochrome brillamment coloré en jaune ou en orange », SMITH commence un examen systématique du milieu intérieur de *Carcinus maenas* alors que ROBSON fait un travail analogue pour *Inachus mauritanicus*.

En ce qui concerne *Carcinus maenas*, SMITH distingue trois sortes d'individus par rapport à la couleur du liquide cavitaires :

1° Ceux qui ont une hémolymph bleu pâle (hémocyanine) et qui sont qualifiés d'incolores ou de non pigmentés ;

2° Ceux dont l'hémolymph présente une teinte rose saumon attribuée à un lipochrome masquant l'hémocyanine ;

3° Ceux qui ont une hémolymph jaune par suite de la présence d'un lipochrome dénommé lutéine.

L'examen de nombreux animaux montre que ces teintes sont, à des degrés variables, caractéristiques de certaines phases de la vie des Crabes.

Une première catégorie d'individus comporte ceux qui viennent de muer ou encore les femelles qui viennent de pondre. Chez ces animaux, la coloration bleutée subsiste un certain temps, puis, au fur et à mesure qu'approche une nouvelle mue ou ponte, le milieu intérieur se charge d'un lipochrome caractéristique pour chaque sexe, entrant ainsi dans l'une ou l'autre des catégories suivantes.

Chez les mâles, la composante rose domine toujours. Chez les femelles, le jaune l'emporte nettement et masque la teinte rose, surtout au moment de la vitellogenèse. Les variantes intermédiaires correspondent à des mélanges des deux pigments.

Pour apprécier ces faits de manière quantitative, SMITH analyse les différentes catégories d'hémolymphes quant à leurs teneurs en matières grasses dont les acides-gras sont le reflet. Sans entrer dans les détails techniques, précisons que les dosages ont été faits chaque fois sur 20 g d'hémolymph obtenue à partir de plusieurs animaux, mais qu'aucune indication n'est donnée quant au nombre, à la taille ou à l'état physiologique. Les résultats sont exprimés en pourcentage de substances éthéro-solubles et se chiffrent à 0,59 % pour les hémolymphes incolores, 0,86 % pour celles qui sont roses et 1,98 % pour celles qui sont jaunes. Ces dernières sont donc deux fois plus riches en lipochromes que les hémolymphes roses et quatre fois plus que les lipides cavitaires incolores. Encore est-il spécifié que les analyses ont eu lieu en septembre, époque à laquelle les ovaires

ne font que commencer leur vitellogenèse et qu'il faudrait s'attendre à des chiffres plus élevés dans une période plus tardive. SMITH en conclut qu'au moment de la maturation de l'ovaire, l'hémolymph des ♀ contient au moins deux fois plus de matières grasses que celle des mâles, même lorsque ceux-ci en renferment un maximum.

Une étude analogue est faite sur l'hépatopancréas, organe qui semble être le lieu de synthèse des substances lipidiques. Lui aussi montre des variations périodiques du taux des matières grasses. A certains moments, il est blanc ou jaune et l'analyse révèle alors 12 % de graisses. En d'autres, il est brun ou translucide ; sa teneur s'abaisse alors à 6 ou 4 %. Cet appauvrissement correspond toujours à des hémolymphes incolores. Par contre, lorsque le liquide cavitair est chargé de lipides, l'hépatopancréas l'est tout autant. Cependant, l'inverse n'est pas toujours vrai, car l'abondance de graisses dans cet organe n'est pas forcément accompagnée d'une hémolymph rose ou jaune, ce qui tend à montrer que les lipides sont d'abord élaborés et stockés dans l'hépatopancréas pour être ensuite convoyés par le milieu intérieur suivant les besoins du métabolisme général. En particulier, à la maturation des ovaires correspond toujours un hépatopancréas riche en graisses et en pigments.

Ces faits étant établis chez les animaux normaux, SMITH s'attache à rechercher les mêmes caractéristiques métaboliques chez les individus sacculinés et, avec ROBSON, constate une profonde influence du parasite sur la composition de l'hémolymph et de l'hépatopancréas de l'hôte. Cette action est toutefois très différente chez *Inachus* et *Carcinus*.

Alors que chez les premiers, les individus parasités des deux sexes ont une hémolymph aussi chargée en lipochromes que les femelles normales en vitellogenèse, il n'en est pas de même chez les seconds dont la plupart des exemplaires sacculinés ont un liquide cavitair incolore ou à peine jaune. D'autre part, l'hémolymph de *Inachus* parasité est toujours rose et ne ressemble donc pas, sous ce rapport, à celle des femelles en vitellogenèse. En ce qui concerne l'hépatopancréas, l'action du parasite est identique pour les deux espèces, à savoir que cet organe reste invariablement très chargé en matières grasses. Finalement, des méthodes histochimiques montrent encore que les racines de la Sacculine sont bourrées de globules gras identiques à ceux observés dans l'hépatopancréas.

C. — Sa substance.

C'est à partir de ces données que SMITH édifie son hypothèse métabolique de la féminisation des Crabes sacculinés que nous pouvons résumer comme suit :

Le stimulus féminisant qui provoque la modification des caractères sexuels secondaires peut provenir des racines du parasite. Comme celui-ci élabore à partir du sang de son hôte des matières de réserve pigmentées semblables en tous points à celles qui sont stockées dans l'ovaire pendant la vitellogenèse, on peut supposer que les racines de la Sacculine, par leur continuelle absorption de matières grasses, en stimulent la constante production en excès et que la présence de telles matières circulant dans les fluides du corps est peut-être la cause du développement des caractères sexuels ♀. Autrement dit, la Sacculine peut jouer le rôle d'une sorte d'ovaire additionnel pathologique dont les exigences métaboliques, semblables à celles d'un ovaire vrai, en ont aussi les répercussions sur la morphologie de l'hôte.

Une telle hypothèse est à vrai dire séduisante par sa simplicité. En réalité, elle se heurte à de nombreuses objections dont certaines ont été soulevées par SMITH lui-même.

En effet, si la surcharge lipidique des mâles d'*Inachus* parasités est évidente du fait d'une coloration constante de l'hémolymph, il n'en est pas de même pour *Carcinus* dont le liquide cavitair, malgré la Sacculine, garde sa seule teinte hémocyanique. SMITH contourne cet obstacle en admettant que cette divergence correspond simplement à une différence de sensibilité des deux espèces à l'action parasitaire, différence qui se reflète bien dans le degré de féminisation de chacune d'elles.

Un autre point reste obscur : sous quelle forme les matières grasses circulent-elles dans l'hémolymph ? Des colorations histochimiques au Bleu Nil montrent bien que la Sacculine, comme les ovules en voie de maturation, prélève les lipides dans l'hémolymph du Crabe sous forme de graisses neutres, mais l'analyse chimique n'arrive à mettre en évidence celles-ci qu'en les décomposant, ce qui laisse supposer qu'elles existent sous forme d'un complexe qui les masque et que la Sacculine, aussi bien que l'ovaire, arrive à détruire.

A ce sujet, pour expliquer le mode de transfert des lipides de l'hépatopancréas vers les ovaires ou la Sacculine, SMITH invente un mécanisme qui est, comme nous le verrons par la suite, une curieuse anticipation vers les cénapses lipoprotéiques. D'après lui, l'hémolymph du Crabe comporterait des molécules protéiques pourvues de chaînes latérales ayant le pouvoir de capter les molécules lipidiques. Cette association se ferait au niveau de l'hépatopancréas. Les complexes formés circuleraient alors librement dans le liquide cavitair, arriveraient au niveau des ovaires ou des racines de la Sacculine, qui les dissocieraient pour fixer les lipides. Les protéines libérées retourneraient ensuite vers l'hépatopancréas pour y fixer de nouvelles charges au destin identique. L'intensité de cette circulation serait commandée par le pouvoir et la rapidité d'absorption des organes destinataires. Ceux-ci agiraient ainsi à distance sur l'hépatopancréas en l'incitant à engendrer de nouvelles molécules.

A la question de savoir qui, des molécules protéiques ou lipidiques libres ou des complexes lipoprotéiques, représente la cause directe de la féminisation des Crabes, SMITH ne répond pas. Ses dernières réflexions relatives à sa propre hypothèse renferment même d'indéniables réserves. L'accroissement de la teneur en lipides ne serait pas forcément la cause directe de la féminisation, mais seulement un phénomène concomitant, une sorte de témoignage des modifications profondes qui affectent le métabolisme général des animaux parasités.

Voilà donc exposée l'hypothèse de SMITH, sa genèse, les faits et les arguments sur lesquels elle est fondée. Si nous avons pris soin de l'analyser ainsi en détail, c'est que nous pensons qu'il importe toujours de bien connaître ce que l'on veut réfuter.

D. — Ses contrôles.

Il est étonnant de constater que, dans les quarante années qui suivent l'élaboration de cette théorie dont le retentissement est pourtant considérable, rares sont les tentatives faites pour la contrôler ou l'approfondir.

Dans la littérature ultérieure, on rencontre d'abord la remarque accidentelle de M. PIERRE (1935) qui constate que l'hépatopancréas d'un spécimen de *Diogenes pugilator*

Roux, parasité par *Septosaccus cuenoti* Duboscq, est plus pauvre en graisses que celui des animaux normaux. Mais le fait que cette observation soit fondée sur un animal lui enlève naturellement toute valeur.

Un peu plus tard, T. E. HUGHES (1940), travaillant sur *Upogebia littoralis* Risso, parasité par l'Epicaride *Gyge branchialis* Cornalia et Panceri, conclut, comme SMITH, à une augmentation de la teneur en lipides des mâles parasités.

Puis, il faut attendre 1944 pour trouver l'intéressant travail de E. G. REINHARD et Th. von BRAND, qui apporte de nouvelles données. Cette étude systématique de la teneur en lipides de *Pagurus pubescens* Kröyer, dans les deux sexes et chez les individus parasités par *Peltoaster paguri* Rathke, utilise d'une part des méthodes histochimiques semi-quantitatives pour l'hépatopancréas de l'hôte et les racines du parasite et, d'autre part, une méthode chimique pour le dosage global des graisses chez ces animaux. Les techniques histochimiques montrent que l'hépatopancréas des Pagures parasités est plus pauvre en graisses que celui des animaux normaux ; que les racines de *Peltoaster* renferment toujours de la graisse, sauf dans leurs extrémités distales, cette teneur étant d'ailleurs très variable suivant les individus ou même les différentes régions d'un même système radiculaire ; enfin, que les matières grasses du sac viscéral du parasite augmentent au fur et à mesure de sa maturation et que les quantités les plus élevées s'observent dans les œufs et nauplii développés dans la cavité palléale. La technique chimique nous apprend qu'en général il y a moins de graisses chez les animaux parasités que chez ceux qui sont indemnes ; que les femelles normales sont plus riches en lipides que les mâles normaux, mais que le parasitisme, loin d'augmenter ce taux, le diminue dans des proportions importantes. Cette constatation est également valable pour les mâles parasités, mais dans une moindre mesure.

Il y a donc opposition entre ces résultats et ceux de G. SMITH.

En 1947, les mêmes auteurs, assistés de S. Mac DUFFIE, mentionnent des essais analogues sur *Pagurus longicarpus* Say, parasité par le Bopyride *Stegophryxius hyptius* Thompson. Ce matériel est intéressant car, comme l'on sait, les Bopyrides sont des parasites externes qui se nourrissent en percant les téguments de l'hôte et en suçant leurs liquides internes. Les relations physiologiques sont donc plus simples et plus faciles à analyser.

Ce travail a montré que le taux lipidique augmente avec la taille des animaux indemnes ou parasités. Entre les individus de même taille de ces deux catégories, les différences sont irrégulières et non significatives. On peut en déduire que le métabolisme lipidique est peu influencé par le parasitisme chez ces espèces, qu'il y a donc opposition avec l'hypothèse de SMITH. Mais il faut souligner qu'il s'agit d'un matériel très différent et que *Stegophryxius* ne modifie nullement les caractères sexuels de son hôte.

Signalons enfin qu'en 1954, O. RUDLOFF et A. VEILLET ont étudié l'influence du Rhizocéphale *Septosaccus cuenoti* sur le métabolisme lipidique du Pagure *Diogenes pugilator*. Leurs analyses montrent que, dans cette espèce, les femelles sont plus riches en graisses que les mâles et que dans les deux sexes le taux lipidique des animaux est augmenté par le parasitisme.

La comparaison de ces données montre que les résultats sont variables avec les espèces et les parasites, et qu'il est difficile de leur accorder une valeur générale.

De la brièveté de cet aperçu bibliographique, il ressort combien ont été rares les tentatives expérimentales d'un contrôle de l'hypothèse de SMITH. Les plus récentes sont en contradiction avec cette théorie, mais de l'avis même de leurs auteurs, elles demandent à être renouvelées et approfondies. Avant de le faire, passons en revue quelques-unes des raisons qui nous y ont incité.

E. — Sa critique.

L'hypothèse de SMITH est basée sur une similitude d'action métabolique entre l'ovaire en vitellogenèse et la Sacculine. Contre cette supposition s'élèvent des arguments qui découlent des faits mêmes décrits par SMITH.

Celui-ci constate par exemple que l'hémolymph de *Carcinus maenas* parasité n'est pas jaune, ou fort peu, et qu'en conséquence, contrairement à la femelle en vitellogenèse, il ne renferme pas de graisses excédentaires. Cette contradiction est expliquée en admettant que, fait non démontré, l'absorption des lipides par les racines de la Sacculine est tellement rapide que leur passage entre hépato-pancréas et parasite devient indécélable. Or, il n'en est pas de même chez *Inachus* où le milieu intérieur des individus parasités est nettement pigmenté et riche en graisses. Dans ce cas, on est donc obligé de supposer, soit que l'hépatopancréas synthétise une graisse plus abondante, soit que la Sacculine la consomme moins rapidement que chez *Carcinus*. La première de ces suggestions est peu vraisemblable, car si l'on admet que le niveau de production de l'hépatopancréas est lié à la consommation du parasite et stimulé par elle, cette stimulation ne peut guère se concevoir que sous forme d'une baisse de la teneur du milieu vecteur, ce qui n'est pas le cas chez *Inachus*. Si l'on retient la seconde, cela revient à dire que l'action de la Sacculine est plus vigoureuse chez *Carcinus*, ce qui est contraire aux faits, puisque les caractères sexuels y sont moins modifiés que chez *Inachus*. On se heurte de la sorte à des contradictions qu'il semble bien difficile d'éluder.

Une autre objection est soulevée par le fait que l'hémolymph des femelles d'*Inachus* en vitellogenèse est jaune, alors que celle des individus parasités est rose, ce qui montre qu'il n'y a pas similitude parfaite entre l'action de l'ovaire et celle de la Sacculine.

On peut aussi se demander pourquoi, puisque l'augmentation de la teneur en lipochromes de l'hémolymph se fait régulièrement à l'approche de la mue et qu'elle est censée modifier les caractères sexuels, elle n'agit pas d'une manière systématique et périodique.

Un argument analogue peut être tiré du fait bien évident que la teneur en graisses de l'hémolymph est sous la dépendance de l'alimentation des animaux, ce que SMITH prouve d'ailleurs expérimentalement en soumettant ses Crabs à une inanition prolongée. Lier les caractères sexuels à ce taux de lipides revient donc à les mettre en partie sous l'obédience du régime alimentaire et à entrevoir la possibilité d'une féminisation par suralimentation lipidique. On voit de suite à quelles conclusions peuvent conduire de telles prémisses.

Mais si de tels raisonnements représentent déjà de sérieuses difficultés pour l'hypothèse examinée, il en est un autre d'un poids plus considérable encore. Il a été évoqué par A. VEILLET, en 1945. Cet auteur constate en effet que les caractères sexuels externes qui se différencient à partir du stade juvénile se féminisent déjà à un moment où l'ovo-

genèse n'existe pas encore, donc qu'ils ne peuvent être sous sa dépendance. Il souligne aussi que la Sacculine agit déjà à une époque où elle n'est qu'interne, chez des hôtes jeunes, sans qu'il y ait aucune indication d'une teneur en lipides plus élevée. L'augmentation du taux de matières grasses se produit apparemment après la sortie de la Sacculine, au moment où celle-ci élabore ses produits sexuels. Elle se manifeste tardivement, à une époque où les caractères sexuels secondaires sont déjà modifiés. On ne saurait donc l'en tenir pour responsable.

C'est à partir de ces observations que A. VEILLET nous a suggéré de contrôler de manière précise l'éventuelle existence de taux lipidiques différents chez des animaux jeunes et parasités.

II. — REFUTATION EXPERIMENTALE

A. — Généralités.

Le problème, tel qu'il se posait, consistait non seulement à rechercher des différences significatives de teneur en matières grasses entre différentes catégories de Crabes jeunes : mâles et femelles, normaux et parasités, ovigères ou dépourvus d'œufs, à Sacculine interne ou externe, mais aussi et surtout à contrôler l'absence de telles différences chez des animaux très féminisés dont le parasite, encore interne, ne pouvait être susceptible de soustraire des quantités appréciables de lipides à son hôte.

La façon dont nous l'avons abordé découle de la conviction que de tels essais ne peuvent être valables que s'ils sont faits sur un nombre considérable d'individus et contrôlés par les méthodes statistiques. Il est indispensable aussi de tenir compte de la taille et de variations individuelles ou physiologiques comme la mue, dont L. RENAUD (1949) a montré qu'elle pouvait faire subir au taux lipidique des variations cycliques allant du simple au double.

Nous avons donc travaillé sur des animaux de taille connue, en groupant dans une même analyse un nombre suffisant d'individus pour que les étapes les plus influentes de la mue puissent s'y contrebalancer.

De la sorte, nous avons réalisé 176 analyses de matières grasses sur 1918 Crabes de toutes catégories.

B. — Méthodologie.

1. Récolte des animaux.

Le but même que nous poursuivions demandait que les dosages soient effectués sur des animaux relativement petits et comportant un pourcentage important d'individus sacculinés.

Pour obtenir un échantillon de population de *Carcinus maenas* répondant à ces conditions, nous l'avons pêché du 16 au 24 août 1950 dans la partie de l'Étang de Thau nommée Degol. De par sa configuration en bassin presque clos, l'Étang de Thau est un lieu très propice à la propagation de la Sacculine. Une proportion importante de Crabes

y sont atteints et la pêche de ces animaux y est toujours fructueuse. Le Degol est une petite baie orientale dont les herbiers constituent un séjour de choix pour les jeunes Crabes qui y émigrent dès leurs premiers stades et y accomplissent les mues correspondantes.

La pêche se fait avec une drague munie d'un filet à mailles de 2 cm environ et tirée à dos d'homme en tous sens, de façon à peigner méthodiquement toute la partie littorale jusqu'à la plus grande profondeur praticable dans ces conditions, soit environ 1,50 m. Dès le début de ses déplacements dans les herbiers, la drague se remplit d'un amalgame d'herbes et de vase qui retient les petits Crabes avec plus d'efficacité encore que le filet. Après chaque dragage, le contenu de l'instrument est ramené sur le sable sec pour y être trié. Il suffit en général de l'étaler sommairement, en surveillant le sable tout autour. Les Crabes les plus minuscules se dégagent par leurs propres moyens, tentent de rejoindre l'eau et peuvent ainsi être capturés aisément.

2. *Conservation des animaux.*

Pour assurer leur conservation jusqu'au moment de l'analyse, les Crabes ont été rincés à l'eau de mer, puis immergés dans une solution de formol à 8 %, neutralisée par de la soude à 0,4 % en présence de rouge neutre. Ce séjour dans un milieu conservateur neutre n'altère pas la teneur en lipides des animaux, même après plusieurs mois.

3. *Classification et mesures.*

a) *Distinction des sexes.*

L'échantillon global a d'abord été séparé en mâles et femelles. La distinction a été faite à vue pour les animaux non parasités, grâce à la forme de l'abdomen. Elle a exigé un examen plus attentif pour ceux qui étaient déjà modifiés par le parasite. Dans ce cas, nous avons écarté l'abdomen du céphalothorax et la distinction est restée facile grâce au nombre et à la forme des pléopodes.

b) *Animaux à carapace molle.*

Pendant la constitution des lots mâles et femelles, nous avons systématiquement éliminé tous les Crabes dont la carapace était molle, c'est-à-dire ceux qui venaient de muer depuis peu et n'avaient pas eu le temps de reminéraliser leur carapace. Cette opération a réalisé l'éviction de tous les stades A et B du cycle d'intermue, étapes pendant lesquelles les animaux sont anormalement pauvres en graisses. Elle a donc supprimé une part importante des variations physiologiques et donné plus d'homogénéité aux lots considérés. Un maximum d'homogénéité serait obtenu en s'adressant uniquement à des Crabes en C₄, étape de relative stabilité physiologique, mais une telle détermination précise n'est guère réalisable sur des lots aussi importants. Nous nous sommes donc contenté d'éliminer les causes d'erreur les plus marquantes.

c) *Animaux à Sacculine externe.*

De chacun des lots ainsi contrôlés ont été séparés les individus portant ou ayant porté une Sacculine externe. Chez les premiers, le sac viscéral est bien visible entre le céphalothorax et l'abdomen. Les seconds, par contre, ne se reconnaissent que grâce à la cicatrice mélanisée qui persiste à l'emplacement du point d'insertion du pédoncule. Pour chaque sexe on aboutit ainsi aux subdivisions suivantes :

- Crabes sans Sacculine externe ;
- Crabes à Sacculine externe ;
- Crabes ayant perdu leur Sacculine externe.

Notons que chez certains animaux nous avons, par la suite, intentionnellement sectionné le sac viscéral pour déceler son éventuelle influence sur la teneur globale en lipides.

d) *Femelles en vitellogenèse ou œuvées.*

L'influence de la vitellogenèse ou de la ponte sur le taux lipidique ne peut être étudiée sur les petits Crabes récoltés en août. La maturation des ovaires ne se produit en effet qu'après la mue de puberté, donc quand les animaux ont au moins 20 mm de long. Comme dans l'Etang de Thau la ponte s'effectue exclusivement en hiver, nous nous sommes adressés à des lots de femelles pêchées en ces lieux en décembre 1951. Certains dosages ont aussi été faits sur des femelles œuvées dont la ponte a été mécaniquement enlevée.

e) *Mesures de taille.*

Comme valeur caractéristique de la taille, nous avons adopté la longueur du céphalothorax mesurée du point le plus antérieur du bouclier céphalothoracique à son bord postérieur, suivant le plan de symétrie (fig. 2, page 16).

Les mesures ont été faites au pied-à-coulisse à vernier au $1/10^{\circ}$ de millimètre. Leur précision est de l'ordre de $\pm 0,1$ mm. Ceci a permis de grouper les individus en classes millimétriques dont chacune a été désignée par son point médian. Par convention, tout animal se trouvant à la limite des deux classes a été rangé dans la classe immédiatement inférieure.

f) *Mesures de féminisation.*

A l'intérieur de chaque classe de taille, les Crabes ont été groupés suivant leur degré de féminisation. Pour ce faire, nous nous sommes servi de la notion d'indice de féminisation introduite par A. VEILLET et définie plus haut (page 15).

Chez les exemplaires d'une taille supérieure à 20 mm, les mesures ont été faites au pied-à-coulisse à vernier au $1/10^{\circ}$ de millimètre. Pour les autres, elles ont été réalisées à la chambre claire, sur papier millimétré.

4. *Analyses chimiques.*

a) *Principe.*

La technique que nous avons utilisée est une adaptation de celle employée par E. G. REINHARD et Th. von BRAND (1944), qui est elle-même une modification de la méthode de M. KUMAGAWA et K. SUTO (1908). Elle consiste à saponifier les graisses des Crabes secs finement broyés, en milieu sodique, à libérer les acides-gras de ces savons par acidification, à les extraire par un solvant organique que l'on évapore ensuite pour peser l'extrait et calculer son pourcentage par rapport au poids sec total des Crabes utilisés.

Soulignons qu'il s'agit d'une technique qui ne dose pas les lipides proprement dits, mais les évalue sous forme de leurs acides-gras constitutifs. De ce fait, elle n'est peut-être pas rigoureuse en valeur absolue, mais amplement suffisante pour les essais com-

paratifs envisagés. Sa relative simplicité la recommande en outre pour des essais en grande série. Des analyses préliminaires sur des fractions aliquotes de substances grasses naturelles nous ont montré que nous pouvions en attendre une précision suffisante.

b) *Dessiccation des Crabes.*

Les animaux formolés ont été soigneusement lavés à l'eau distillée, puis desséchés à l'étuve à 105° jusqu'à poids constant (18 heures environ).

c) *Pesées.*

Les Crabes secs ont été pesés au 1/10^e de milligramme. Ont été soumis à l'analyse des poids secs allant jusqu'à 16 grammes environ.

d) *Broyage.*

Une pulvérisation très poussée a été obtenue par broyage dans un appareil « Turmix » avec 50 ml de NaOH à 15 %, pendant dix secondes à vitesse réduite et une minute à 12.000 tours/minute. L'étanchéité du récipient a dû être renforcée, pour éviter toute perte, par un couvercle en matière plastique découpé suivant le galbe du verre. Le produit du broyage a été récupéré intégralement en le transvasant dans un erlenmeyer jaugé à 250 ml et en rinçant au jet de pissette avec de la soude chaude à 15 % le couvercle, le récipient et l'entonnoir de transvasement. Ce rinçage a été poursuivi jusqu'à ce que l'erlenmeyer renferme un total de 250 ml de suspension.

e) *Saponification.*

Elle a été faite au bain-marie bouillant pendant deux heures, sous reflux d'un tube en verre de 1,20 m. Pour assurer un contact étroit et renouvelé de la soude avec les particules solides, le mélange a été agité de nombreuses fois pendant la saponification. Après refroidissement, la suspension a été transvasée dans une ampoule à décanter de un litre. L'erlenmeyer a ensuite été rincé avec 50 ml de soude chaude.

Les acides gras ont été libérés par addition d'HCl pur jusqu'à neutralisation (100 à 120 ml d'HCl par analyse) contrôlée au papier de tournesol. L'acide dissout en même temps les sels minéraux des fragments de carapace dont il ne reste ainsi que la chitine.

f) *Extractions.*

Après refroidissement, le mélange neutralisé a été extrait par agitation pendant cinq minutes avec 50 ml d'éther sulfurique pur. L'épiphase, qui contient toujours les acides-gras et toutes les substances éthéro-solubles, a été recueillie dans une capsule de verre par filtration sur filtre plissé. Nous avons fait ensuite deux autres extractions identiques dont l'éther a été ajouté au précédent. Le filtre, qui renferme les fragments de chitine flottant dans l'épiphase, a été rincé à l'éther et conservé. La totalité des fractions éthérées a alors été évaporée sur platine chauffante dans un endroit aéré, laissant un résidu cireux, d'une teinte variant du rouge à l'orange et semi-fluide à température ordinaire. Souvent, ce résidu comportait des cristaux salins entraînés par les traces d'eau de l'éther. Comme ceux-ci auraient faussé les dosages, nous avons pris soin de les éliminer en reprenant l'extrait sec par un peu d'éther anhydre, dans lequel ils sont insolubles, et que nous avons évaporé dans un vase à tarer de poids connu. Le résidu sec définitif a été pesé au 1/10^e de milligramme.

Dans l'ampoule à décanter, l'hypophase contient en suspension les fragments de chitine déminéralisée. Ceux-ci sont recueillis par filtration sur Buchner garni d'une rondelle de papier filtre de poids sec connu. Après un rapide essorage à la trompe à eau, l'ensemble papier-chitine est desséché à 105° pendant dix-huit heures, puis pesé. On obtient ainsi le poids de la chitine contenue dans l'hypophase. Il suffit de lui ajouter celui de la chitine pesée sur le filtre plissé pour avoir le poids sec total de la chitine des animaux broyés.

g) *Expression des résultats.*

Le nombre des analyses a nécessité l'emploi de fiches d'analyse dont un exemplaire est reproduit ci-dessous.

FICHE D'ANALYSE

N° 149

LIPIDES

Date : 21-12-1951.

Animal : 2 *Carcinus maenas*. Sexe : ♀

Longueur du céphalothorax : 29 et 30 mm.

Degré de féminisation : —

Particularités : Animal en vitellogenèse.

Dessiccation { début : 20-12-51 à 14 h.
fin : 21-12-51 à 8 h.

Poids sec total : 9,232 g.

Saponification { début : 8 h. 45.
fin : 10 h. 45.

Filtre à éther { filtre : 1,093 g. } chitine I : 0 g.
filtre + chitine : 1,093 g.

Filtre à chitine { filtre : 0,493 g. } chitine II : 0,917 g.
filtre + chitine : 1,410 g.

Chitine totale : = chitine I + chitine II = 0,917 g.

Vase à tarer lipides { Vase : 55,036 g. } lipides : 0,814 g.
Vase + lipides = 55,850 g.

% de lipides/poids sec total : 8,81 %.

% de lipides/poids sec total - chitine : 9,80 %.

% de chitine/poids sec total : 9,93 %.

Les résultats y sont exprimés de la manière suivante :

— La teneur en acides-gras et substances éthéro-solubles (conventionnellement dénommés lipides) y est calculée, d'une part en pourcentage par rapport au poids sec total des Crabes, d'autre part en pourcentage par rapport à ce poids sec total diminué du poids de la chitine. Ce deuxième mode d'expression a été préconisé par E. G. REINHARD et Th. von BRAND (1944) qui le considèrent comme plus représentatif de la teneur en lipides des seuls organes internes du Crabe, la carapace se trouvant ainsi partiellement exclue.

— Les pourcentages de chitine par rapport au poids sec total des Crabes ont également été calculés.

A partir de ces documents, les données numériques ont été groupées de manière à faire ressortir les lois éventuelles dont elles pouvaient être l'expression.

Ce sont ces résultats qui vont être passés en revue pour les différentes catégories de Crabes soumises à l'analyse, en tirant chaque fois des conclusions.

C. — Résultats.

1. — *Crabes ♂*.

a) *Sans sacculine externe*.

— *Données numériques de l'échantillon*.

96 analyses ont été effectuées sur 971 Crabes ♂ groupés en 16 classes millimétriques de 7 à 22 mm. Les données numériques sont exprimées dans le tableau 1 (pages 34 et 35).

Son examen montre que, dans chaque classe de taille, les Crabes ont été rangés en 6 catégories de féminisation croissante.

La quatrième colonne indique le nombre d'individus analysés par classe de féminisation. On remarquera que, comme nous l'avons déjà souligné dans une étude statistique antérieure (R. FRENTZ, 1954), parmi les Crabes les plus petits, les individus féminisés sont rares, mais qu'ils deviennent de plus en plus nombreux lorsque la taille augmente. Ainsi, dans la classe 22 mm, ce sont les animaux non féminisés qui font presque défaut.

La cinquième colonne exprime la fréquence des Crabes par classe de taille et montre que les individus de 13 mm sont les plus nombreux.

Les sixième et septième colonnes rapportent respectivement les poids secs moyens par classe de féminisation et par classe de taille.

On trouve ensuite successivement :

— Huitième colonne : le pourcentage de lipides par rapport au poids sec total par classe de féminisation ;

— Neuvième colonne : le pourcentage moyen de lipides par rapport au poids sec total par classe de taille ;

— Dixième colonne : le pourcentage de lipides par rapport au poids sec total diminué du poids de la chitine, par classe de féminisation ;

— Onzième colonne : le pourcentage de lipides par rapport au poids sec total diminué du poids de la chitine, par classe de taille ;

— Douzième colonne : le pourcentage de chitine par rapport au poids sec total par classe de féminisation ;

— Treizième colonne : le pourcentage de chitine par rapport au poids sec total par classe de taille.

TABLEAU I

No Analyse	Taille (mm)	Indice de fémini- sation	Fréquence		Poids sec moyen (g)		% de lipides par rapport au				% de chitine sèche	
			par classe de fémini- sation	par classe de taille	par classe de fémini- sation	par classe de taille	poids sec par classe de fémini- sation	poids sec par classe de taille	poids sec - chitine par classe de fémin.	poids sec - chitine par classe de taille	par classe de fémini- sation	par classe de taille
11	22	1,21	4	15	1,047	1,049	4,12	3,36	4,30	3,67	11,28	10,55
12	22	1,29	2		1,032		2,32		2,63		11,77	
13	22	1,33	3		0,804		2,48		2,78		10,77	
14	22	1,41	5		1,110		2,73		3,11		12,08	
15	22	1,55	1		1,254		5,18		5,56		6,85	
16	21	1,19	3	16	0,897	0,898	2,86	2,84	3,25	3,21	12,18	11,40
17	21	1,28	6		0,688		2,27		2,59		11,43	
18	21	1,34	4		0,988		3,99		4,48		10,87	
19	21	1,52	3		1,021		2,25		2,53		11,15	
20	20	1,20	5	15	0,865	0,753	3,99	3,71	4,49	4,11	11,02	9,98
21	20	1,30	3		0,819		3,53		3,87		9,76	
22	20	1,37	2		0,490		4,38		4,75		7,48	
23	20	1,42	5		0,841		2,94		3,33		11,69	
24	19	1,18	2	27	0,491	0,734	3,05	3,55	3,38	4,02	9,77	11,67
25	19	1,22	6		0,732		4,05		4,58		11,60	
26	19	1,29	5		0,773		3,69		4,19		11,86	
27	19	1,32	4		0,812		4,64		5,20		10,64	
28	19	1,37	3		0,780		3,28		3,75		12,51	
29	19	1,42	3		0,847		4,09		4,71		13,18	
30	19	1,48	4		0,705		2,09		2,38		12,18	
96	18	1,21	7	45	0,613	0,610	3,96	3,79	4,56	4,34	13,29	12,73
97	18	1,29	9		0,529		4,09		4,65		12,16	
98	18	1,35	6		0,547		2,71		3,12		13,18	
99	18	1,38	7		0,647		4,03		4,65		13,19	
100	18	1,42	9		0,640		3,72		4,28		12,95	
101	18	1,52	7		0,686		4,22		4,78		11,64	
102	17	1,15	4	59	0,625	0,527	5,16	3,85	5,79	4,39	10,96	12,70
103	17	1,22	10		0,522		3,71		4,25		12,77	
104	17	1,27	10		0,428		2,94		3,37		12,84	
105	17	1,31	9		0,516		3,44		3,94		12,79	
106	17	1,36	8		0,541		4,01		4,60		12,91	
107	17	1,41	9		0,530		4,83		5,55		12,89	
108	17	1,52	9		0,531		2,84		3,29		13,77	
31	16	1,16	7	98	0,449	0,446	4,03	3,36	4,54	3,77	11,03	10,60
33	16	1,23	5		0,431		3,24		3,68		12,10	
35	16	1,26	9		0,399		3,31		3,73		11,43	
37	16	1,28	5		0,487		2,91		3,21		9,55	
39	16	1,30	7		0,424		3,26		3,58		8,88	
41	16	1,33	10		0,416		3,41		3,83		11,05	
43	16	1,35	7		0,470		3,61		4,01		9,87	
44	16	1,38	6		0,478		3,31		3,66		9,72	
42	16	1,40	5		0,417		3,73		4,13		9,58	
40	16	1,42	11		0,471		2,56		2,86		10,42	
38	16	1,47	8		0,414		2,86		3,18		10,00	
36	16	1,51	6		0,471		3,43		3,87		11,35	
34	16	1,54	6		0,454		3,63		4,10		11,51	
32	16	1,57	6		0,472		3,88		4,40		11,99	

TABLEAU I (suite)

No Analyse	Taille (mm)	Indice de féminisation	Fréquence		Poids sec moyen (g)		% de lipides par rapport au				% de chitine sèche	
			par classe de féminisation	par classe de taille	par classe de féminisation	par classe de taille	poids sec par classe de féminisation	poids sec par classe de taille	poids sec - chitine par classe de fémin.	poids sec - chitine par classe de taille	par classe de féminisation	par classe de taille
45	15	1,15	4	107	0,348	0,357	2,58	3,04	2,85	3,42	9,26	10,85
47	15	1,21	5		0,351		2,61		2,90		9,96	
49	15	1,28	11		0,372		3,34		3,79		12,00	
51	15	1,32	17		0,341		3,27		3,69		11,47	
53	15	1,36	10		0,304		2,62		2,95		11,04	
54	15	1,38	10		0,380		3,41		3,84		11,16	
52	15	1,42	16		0,364		3,30		3,77		12,31	
50	15	1,47	14		0,373		3,49		3,91		10,68	
48	15	1,52	15		0,343		2,98		3,35		10,89	
49	15	1,58	5		0,397		2,86		3,17		9,75	
55	14	1,18	8	101	0,309	0,308	3,39	3,49	3,83	3,94	11,32	11,32
57	14	1,27	8		0,330		3,96		4,41		10,08	
59	14	1,32	13		0,302		3,73		4,20		11,20	
61	14	1,37	19		0,315		4,10		4,64		11,60	
62	14	1,42	16		0,310		3,59		4,09		12,20	
60	14	1,47	13		0,298		2,85		3,23		11,58	
58	14	1,52	18		0,315		3,20		3,62		11,53	
56	14	1,59	6		0,291		3,14		3,54		11,10	
63	13	1,17	6	110	0,242	0,243	3,37	3,71	3,84	4,22	12,37	12,00
65	13	1,27	9		0,222		3,75		4,27		12,11	
67	13	1,32	12		0,242		3,60		4,11		12,42	
69	13	1,37	24		0,241		3,58		4,07		12,02	
70	13	1,42	14		0,234		4,12		4,65		11,53	
68	13	1,47	23		0,269		3,88		4,44		12,47	
66	13	1,52	11		0,256		4,22		4,73		10,89	
64	13	1,58	11		0,245		3,22		3,67		12,25	
71	12	1,26	15	89	0,190	0,200	3,95	3,74	4,50	4,25	12,27	12,60
73	12	1,32	9		0,220		4,59		4,94		12,15	
75	12	1,37	12		0,212		4,08		4,72		12,73	
77	12	1,42	12		0,190		3,46		3,98		13,14	
76	12	1,46	17		0,197		3,45		3,97		13,10	
74	12	1,52	12		0,196		3,39		3,90		12,87	
72	12	1,59	12		0,196		3,30		3,75		11,98	
78	11	1,28	15	100	0,142	0,153	3,56	3,95	4,11	4,41	13,28	12,38
80	11	1,36	10		0,153		4,04		4,72		14,30	
81	11	1,42	18		0,150		4,01		4,54		11,71	
83	11	1,47	16		0,146		3,51		4,00		12,29	
84	11	1,52	19		0,161		3,96		4,48		11,60	
82	11	1,57	12		0,153		4,35		4,90		11,06	
79	11	1,63	10		0,169		4,24		4,84		12,42	
85	10	1,39	24	64	0,120	0,116	3,55	3,63	4,04	4,12	12,24	11,98
86	10	1,50	21		0,113		3,60		4,09		11,83	
87	10	1,59	19		0,115		3,75		4,25		11,89	
88	9	1,40	25	48	0,084	0,081	3,44	3,48	3,92	3,94	12,21	11,62
89	9	1,57	23		0,079		3,53		3,97		11,04	
90	8	1,41	19	43	0,063	0,062	3,92	3,82	4,40	4,28	10,78	10,56
91	8	1,58	24		0,062		3,73		4,17		10,34	
92	7	1,45	13	34	0,042	0,042	3,14	3,83	3,33	4,18	6,09	8,13
93	7	1,60	21		0,042		4,52		5,03		10,18	

Ces données ont permis de calculer le pourcentage moyen en lipides par rapport au poids sec total pour l'ensemble des 974 Crabes ♂ :

% moyen : 3,57 ; écart-type : 0,32 ; erreur-standard : 0,082.

Calculées par rapport au poids sec total diminué de la chitine, ces mêmes valeurs deviennent :

% moyen : 4,02 ; écart-type : 0,30 ; erreur-standard : 0,077.

Ces valeurs sont un peu inférieures à celles trouvées par E. G. REINHARD et Th. von BRAND (1944) chez 13 mâles de *Pagurus pubescens* parasités par *Peltogaster paguri* (respectivement 4,47 % et 8,39 %). Elles restent néanmoins du même ordre. On notera aussi que les taux obtenus par déduction de la chitine présentent, chez *Peltogaster*, un écart beaucoup plus considérable que dans le cas de *Carcinus maenas*. Chez ces derniers, la chitine paraît donc représenter une fraction plus faible du poids sec total.

— *Corrélation entre les lipides et la taille.*

Ces premiers faits établis, nous nous sommes demandé s'il existait, dans le lot considéré, une corrélation quelconque entre la teneur en lipides et la taille. Pour en juger, nous avons calculé le coefficient de corrélation r entre la taille et la teneur en lipides pour l'ensemble des 16 classes millimétriques. La valeur trouvée pour r est —0,388. Or, pour $N : 16$, les tables de Fisher donnent un coefficient de 0,497. Le coefficient expérimental étant inférieur à ce nombre, il ne diffère pas significativement de 0 et on ne peut affirmer aucune corrélation certaine entre la taille et la teneur en lipides.

Graphiquement, les variations du taux des lipides par rapport à la taille sont représentées par les points de la figure 3 (page 37). La ligne de régression correspondant à ces points est donnée par l'équation :

$$y = 0,274x + 3,965$$

Sa pente apparente n'est pas significative.

On peut évidemment se demander si la corrélation ainsi recherchée n'est pas masquée du fait que les Crabes considérés ne présentent pas tous le même degré de féminisation. Il est donc utile de montrer que cette corrélation n'existe pas pour des individus de tailles différentes, mais ayant tous le même degré de féminisation.

Dans ce but, nous avons examiné les valeurs relatives à une sélection de 88 Crabes ♂ de 12 à 22 mm, dont l'indice de féminisation varie de 1,30 à 1,34. Le taux moyen des lipides de ces animaux est de 3,57 % (écart-type : 0,65). Le coefficient de corrélation lipides-taille est de $r : 0,304$. Il est notablement inférieur à celui exigé par les tables de Fisher pour un tel échantillon (0,602). Il n'y a donc pas de corrélation certaine entre la teneur en lipides et la taille des animaux, même lorsque ceux-ci sont également féminisés. Ces faits sont illustrés par la figure 4 (page 37) où la ligne de régression a été calculée par l'équation :

$$y = -0,0621x + 4,6257$$

— *Corrélation entre les lipides et la féminisation.*

Une fois établie cette indépendance à peu près certaine entre le taux lipidique et la taille, nous avons recherché l'existence d'une corrélation entre ce même taux et le degré

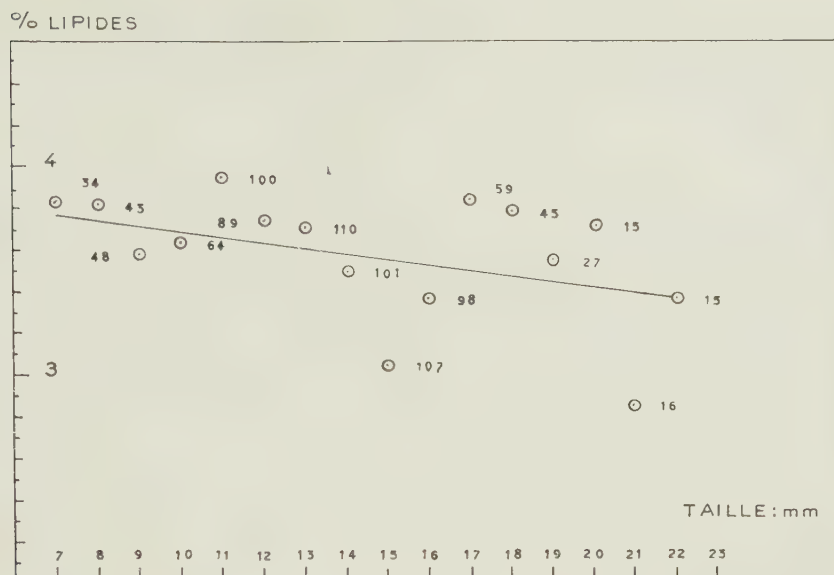


FIG. 3. — Variations du taux des lipides par rapport à la taille chez 971 Crabs ♂ sans Sacculine externe. Ligne de régression. (Chaque point est accompagné du nombre d'individus dont il représente le pourcentage moyen).

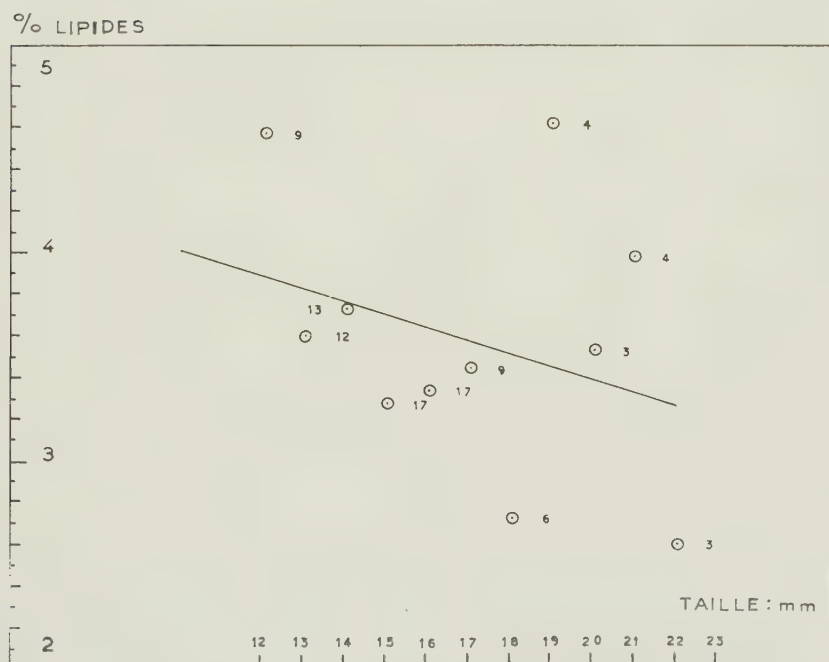


FIG. 4. — Variations du taux des lipides par rapport à la taille chez 88 Crabs ♂ sans Sacculine externe et présentant le même indice de féminisation. Ligne de régression. (Chaque point est accompagné du nombre d'individus dont il représente le pourcentage moyen).

de féminisation, ceci chez des Crabes de même taille. Ce problème est crucial pour la validation ou la réfutation de l'hypothèse de SMITH. En effet, si la féminisation des Crabes ♂ parasités est vraiment provoquée par une synthèse excédentaire de lipides, il est logique d'admettre que les individus les plus féminisés renferment plus de matières grasses, et inversement.

Dans chaque classe millimétrique de 11 à 19 mm, les pourcentages trouvés ont donc été classés dans l'ordre de féminisation des sujets. Pour chaque classe ont été calculés : le nombre total d'individus, le taux moyen des lipides, son écart-type et le coefficient de corrélation pour la teneur en lipides par rapport à la féminisation dans cette classe. Le coefficient de corrélation trouvé pour chaque classe a été comparé, chaque fois, avec la valeur témoin des tables de Fisher, ce qui a permis de conclure à l'existence ou à l'absence d'une corrélation. Une vue d'ensemble des données numériques et des conclusions est consignée dans le tableau II ci-dessous.

TABLEAU II

Taille (mm)	Nombre d'animaux	% lipides	Ecart- type	r	r _f (Fisher)	Corrélation?
11	100	3,95	0,33	0,783	0,755	oui
12	89	3,74	0,48	— 0,534	0,755	non
13	110	3,71	0,39	0,398	0,707	non
14	101	3,49	0,43	— 0,360	0,707	non
15	107	3,04	0,39	— 0,176	0,632	non
16	98	3,37	0,36	0,002	0,532	non
17	59	3,85	0,86	— 0,559	0,755	non
18	45	3,79	0,49	0,172	0,811	non
19	27	3,55	0,80	— 0,479	0,755	non

Son examen montre que, huit fois sur neuf, aucune corrélation certaine ne peut être décelée entre la teneur en lipides et la féminisation des Crabes. Il en ressort que, contrairement à ce que pense SMITH, les lipides ne peuvent être tenus pour responsables de la modification des caractères sexuels externes des Crabes sacculinés.

La même conclusion a été retrouvée par une voie analogue, mais non identique. Un calcul semblable a été refait pour l'ensemble des 971 Crabes ♂ sans Sacculine externe. A partir des données du tableau I (pages 34-35), nous avons établi le taux lipidique moyen par classe de féminisation et indépendamment de la taille (Voir tableau III, page 39), puis le coefficient de corrélation entre ces taux moyens et les degrés de féminisation. Il est de 0,554 alors que la valeur correspondante des tables de Fisher s'élève à 0,632. Ici encore, aucune corrélation ne peut être affirmée entre les variables envisagées et ce résultat confirme le précédent.

TABLEAU III

Fré- quences	Taille (mm)	INDICES DE FÉMINISATION									
		1,15 à 1,19	1,20 à 1,24	1,25 à 1,29	1,30 à 1,34	1,35 à 1,39	1,40 à 1,44	1,45 à 1,49	1,50 à 1,54	1,55 à 1,59	1,60 à 1,64
15	22		4,12	2,32	2,48		2,73			5,18	
16	21	2,86		2,27	3,99				2,25		
15	20		3,99		3,53	4,38	2,94				
27	19	3,05	4,05	3,69	4,64	3,28	4,09	2,09			
45	18		3,96	4,09		2,71 4,03	3,72		4,22		
59	17	5,16	3,71	2,94	3,44	4,01	4,83		2,84		
98	16	4,03	3,24	3,31 2,91	3,26 3,41	3,61 3,31	3,73 2,56	2,86	3,43 3,63	3,88	
107	15	2,58	2,61	3,34	3,27	2,62 3,41	3,30	3,49	2,98	2,86	
101	14	3,39		3,96	3,73	4,10	3,59	2,85	3,20	3,14	
110	13	3,37		3,75	3,66	3,58	4,12	3,88	4,22	3,22	
89	12			3,95	4,59	4,08	3,46	3,45	3,39	3,30	
100	11			3,56		4,04	4,01	3,51	3,96	4,35	4,24
64	10					3,55			3,60	3,75	
48	9						3,44			3,53	
43	8						3,92			3,73	
34	7							3,14			4,52
971		24,44 : 7	25,68 : 7	40,09 : 12	39,94 : 11	50,71 : 14	50,44 : 14	25,27 : 8	37,72 : 11	36,94 : 10	8,76 : 2
		3,49	3,66	3,34	3,63	3,62	3,60	3,15	3,43	3,69	4,38

Une représentation graphique de ces résultats est donnée par la figure 5, page 40.

Un dernier test a été réalisé en recherchant l'existence d'une différence significative entre les taux lipidiques moyens des groupes extrêmes de féminisation entre eux et entre chacun d'eux et le groupe moyen. Pour cela, les pourcentages de lipides ont été répartis en trois catégories :

- 1° Ceux qui correspondent aux animaux très féminisés : indice R inférieur à 1,3 ;
- 2° Ceux des Crabes de féminisation moyenne : $R = 1,35 - 1,45$;
- 3° Ceux des individus peu ou non féminisés : R supérieur à 1,50.

Pour chacun de ces groupes ont été calculés le taux lipidique moyen et l'écart-type.

Gr. 1 : % lipidique moyen = 3,47 écart-type = 0,66.

Gr. 2 : % lipidique moyen = 3,61 écart-type = 0,54.

Gr. 3 : % lipidique moyen = 3,63 écart-type = 0,61.

Le contrôle statistique appliqué aux groupes 1 et 2 montre qu'il n'existe pas de différence significative entre eux. Il en est de même lorsqu'on considère respectivement les groupes 1 et 3, puis 2 et 3.

Une fois encore, force est d'admettre que la féminisation plus ou moins poussée des caractères sexuels externes n'est pas le reflet d'une variation du taux lipidique des Crabes parasités, donc qu'elle ne saurait en dépendre.

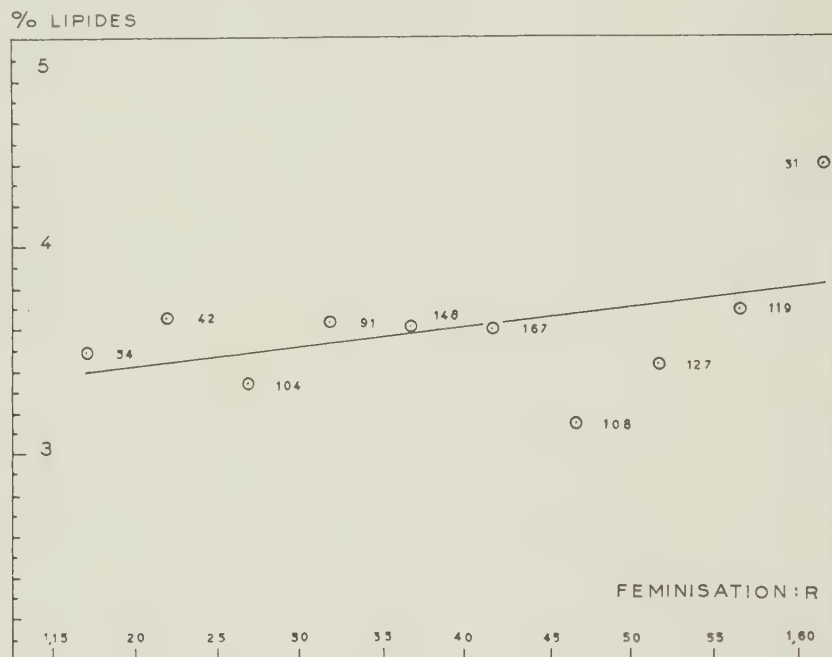


FIG. 5. — Variation du taux des lipides par rapport à la féminisation chez 971 Crabes ♂ sans Sacculine externe. Ligne de régression. (Chaque point est accompagné du nombre d'individu dont il représente le pourcentage moyen).

— Conclusions.

Un effort considérable d'analyse chimique et statistique a été fait sur ce lot de Crabes ♂ doublement intéressant par son importance numérique et la possibilité qu'il offre d'étudier des liens éventuels entre la teneur en lipides et la féminisation des caractères sexuels à une époque où ceux-ci sont déjà fortement modifiés, sans qu'il y ait trace de Sacculine externe.

Après avoir établi l'indépendance du taux lipidique vis-à-vis de la taille des Crabes, l'emploi des tests statistiques nous a permis, par des voies différentes, de réunir un faisceau de preuves convergentes permettant d'affirmer que la même indépendance existe entre la teneur en matières grasses et le degré de féminisation.

A elle seule, une telle démonstration enlève déjà à l'hypothèse de SMITH l'essentiel de ses fondements ; mais l'examen des autres lots de Crabes apporte encore des arguments supplémentaires à une telle réfutation.

b) Avec Sacculine externe jeune.

L'échantillon global dragué dans le Degol se compose essentiellement de Crabes très jeunes. Ceux-ci n'ont été infestés par le parasite que depuis peu et il est compréhensible

que les Sacculines externes y soient peu nombreuses. Le présent lot est donc beaucoup plus réduit que le précédent. On sait en effet que le sac viscéral n'apparaît que chez les Crabes mesurant au moins 11 mm.

Ont été étudiés 89 animaux de 11 à 23 mm.

Avant de considérer les résultats des analyses chimiques, notons quelques remarques biologiques que cet échantillon a permis de faire.

— *Remarques biologiques.*

Les données numériques concernant ces Crabes sont consignées dans le tableau IV (pages 42-43).

La première colonne indique les classes de taille alors que la seconde précise la fréquence des individus de chaque classe.

La troisième colonne exprime l'indice de féminisation de chaque Crabe analysé, l'ensemble des indices étant classé par ordre de féminisation décroissante. On ne manquera pas de noter que la plupart des classes numériquement suffisantes renferment à peu près tout l'éventail des indices de féminisation. Par exemple, la classe 15 mm comporte aussi bien des individus de $R = 1,10$ que de $R = 1,55$. Seules, les classes des plus grandes tailles ne renferment plus d'animaux non ou peu modifiés. Ceci montre bien que le degré de féminisation des caractères sexuels est parfaitement indépendant de la sortie du sac viscéral de la Sacculine. Un Crabe peut ainsi porter une Sacculine externe de taille appréciable et rester pratiquement non féminisé. On peut donc objecter à l'hypothèse de SMITH que si la féminisation des Crabes ♂ dépendait d'une stimulation de leur métabolisme lipidique par le parasite, il n'y aurait aucune raison pour que ceux d'entre eux qui ont déjà nourri une Sacculine complète avec son sac viscéral n'aient pas encore subi cette stimulation, alors que d'autres, ne portant qu'un parasite interne beaucoup moins développé et moins exigeant, sont déjà transformés. Ces modifications doivent dépendre de facteurs autres que la taille de l'hôte et l'état interne ou externe de la Sacculine.

La quatrième colonne exprime, par des symboles, la segmentation totale (S), partielle (PS) ou inexistante (NS) des segments abdominaux III, IV et V du mâle. On se souvient en effet que chez les jeunes mâles normaux, ces segments sont nettement distincts jusqu'aux stades IV et V (Crabes de 3.75 à 5 mm), qu'ils se soudent ensuite, alors que chez les femelles, ils restent toujours indépendants. Or, l'un des signes de féminisation par la Sacculine réside précisément dans la réindividualisation progressive des segments soudés. L'examen des 89 abdomens portant ou ayant porté des Sacculines externes montre que la réapparition des lignes articulaires ne correspond à aucun indice de féminisation précis. Si, dans certains cas, la nouvelle segmentation débute déjà avec l'indice 1,5, si, en général, elle est achevée pour des valeurs inférieures à 1,3, il n'en est pas moins vrai qu'il existe aussi de nombreuses exceptions à cette règle. C'est ainsi que, parmi les mâles de 15 mm, on trouve un individu dont l'abdomen très élargi ($R = 1,25$) n'est que partiellement segmenté. Ailleurs, la segmentation totale est très précoce et accompagne un indice 1,43 encore fort proche des caractéristiques ♂. Nous retiendrons que, comme beaucoup d'autres, ce processus garde la marge de variabilité de tous les phénomènes biologiques.

TABLEAU IV

Taille (mm)	Fréquence	Féminisation	Segmentation abdomen	Insertion Sacculine	Largeur Sacculine (mm)
11	3	1,27 1,29 1,56	S S NS	2 3 2-3	2 2 3
12	8	1,25 1,26 1,30 1,30 1,36 1,38 1,48 1,55	S S S S S S PS NS	2 3 2 2 3 2 2 2	2 T 2 4 8 T 2 2
13	11	1,20 1,21 1,25 1,29 1,30 1,30 1,30 1,31 1,31 1,32 1,40	S S S S S S PS S S S PS	2 2 3 2 2 2 2-3 3 2 2 2-3	3 4 2 8 2 1 1 3 2 2 3
14	13	1,10 1,16 1,20 1,21 1,23 1,26 1,28 1,31 1,31 1,35 1,36 1,39 1,55	S S S S S S S S PS PS PS PS PS PS	4-5 3 2-3 3 2 2 2 { 2 3 2 2 2 2 2	6 5 3 3 5 2 { 3 1 4 7 3 2 2 2
15	12	1,12 1,12 1,20 1,21 1,25 1,32 1,34 1,39 1,41 1,42 1,42 1,43	S S S S PS S NS PS PS NS NS S	2-3 2 1 2 { 3-4 4-5 2-3 1-2 3 1 2 1 1	6 4 2 { 1 2 1 T 1 2 1 1 1 1

TABLEAU IV(suite)

Taille (mm)	Fréquence	Féminisation	Segmentation abdomen	Insertion Sacculine	Largeur Sacculine (mm)
16	8	1,17	S	3	7
		1,22	S	3	T
		1,22	S	2-3	3
		1,28	S	2-3	2
		1,30	S	1	2
		1,31	S	2	T
		1,32	PS	3	2
		1,47	PS	Thx	1
17	9	1,18	S	1-2	4
		1,32	S	1-2	5
		1,34	PS	4	3
		1,38	S	1	3
		1,38	S	2	T
		1,41	NS	2	6
		1,42	PS	3	T
		1,44	NS	2	3
18	8	1,45	NS	1	T
		1,23	S	3	3
		1,25	S	2	1
		1,25	S	2	3
		1,26	S	2-3	4
		1,30	S	2-3	3
		1,31	PS	{ 1 1	{ 1 2
		1,41	PS	3-4	2
19	7	1,41	PS	{ 3 3	{ 3 2
		1,22	S	2-3	3
		1,24	S	2-3	4
		1,25	S	2	1
		1,26	PS	2	2
		1,29	S	2-3	2
		1,41	PS	3-4	1
		1,43	PS	3	3
20	4	1,27	S	{ 3 3	{ 1 2
		1,30	S	2-3	2
		1,34	PS	2-3	1
		1,38	NS	2-3	4
21	2	1,20	S	3	4
		1,32	S	1	2
22	2	1,30	S	2	1
		1,31	PS	2	3
23	2	1,30	PS	2	2
		1,31	S	2	2

La cinquième colonne indique le numéro d'ordre du segment abdominal au niveau duquel s'effectue la sortie du sac viscéral. Lorsque cette émergence se fait à la limite de deux segments, ceux-ci sont indiqués tous les deux. Notons le cas curieux d'un sac viscéral fixé dans la région ventrale postérieure du céphalothorax (dernier Crabe de 16 mm : Thx). Ces données, résumées en pourcentage dans le tableau V ci-dessous, montrent que l'insertion du pédoncule se fait préférentiellement au niveau des segments II ou III. Cependant, cette localisation n'a rien de rigoureux et les Sacculines se trouvent aussi quelquefois en position plus proximale (segment I) ou plus distale (segments IV, V). Ces observations ne concordent pas tout à fait avec celles de A. VEILLET (1945) qui trouve un maximum d'insertion (40 %) à cheval sur les segments II et III, et leur absence totale sur le segment I.

La sixième colonne renseigne sur la taille des sacs viscéraux exprimés par la valeur en millimètres de la plus grande dimension dans le plan de symétrie du parasite. Elle précise aussi les cas où la Sacculine externe était tombée (T) et ne se signalait plus que par les vestiges d'une cicatrice souvent mélanisée. Ces données montrent que des hôtes encore très petits (12 mm) peuvent déjà porter des sacs viscéraux de dimensions appréciables (8 mm) et que souvent, dans ces catégories, les sacs viscéraux sont aussi, sinon plus gros, que ceux que portent des Crabes plus âgés. Leur taille dépend certainement, à la fois du temps écoulé depuis leur sortie, de la plus ou moins grande extension du système radiculaire et de la valeur nutritive de l'hôte. La comparaison sommaire de ces tailles montre aussi que le degré de féminisation est indépendant du développement du sac viscéral. C'est ainsi qu'une Sacculine de 8 mm peut vivre sur un hôte moins féminisé qu'un Crabe de même taille portant un parasite de 2 mm seulement.

TABLEAU V

*Localisation des insertions de sacs viscéraux
chez 89 Crabes ♂ de 7 à 23 mm (95 Sacculines)*

Numéro du segment	Nombre de Sacculines	%
I	10	10,50
I-II	4	4,10
II	38	40,00
II-III	16	16,80
III	20	21,00
III-IV	3	3,10
IV	1	1,05
IV-V	2	2,10
V	0	0,00
V-VI	0	0,00
VI	0	0,00
Thx	1	1,05

En résumé, ces observations purement morphologiques ou biométriques montrent que la féminisation des mâles est indépendante de la sortie du sac viscéral et de la taille du parasite, que cette sortie s'effectue de préférence au niveau des segments abdominaux II ou III et, qu'enfin, la réindividualisation des segments normalement soudés chez le mâle se fait au fur et à mesure de l'élargissement de l'abdomen, avec cependant une grande marge de variabilité.

Examinons maintenant les résultats des analyses de lipides faites sur cet échantillon.

— *Analyses lipidiques.*

Un incident technique ayant invalidé le dosage effectué sur les Crabes de 14 mm, les résultats portent, non sur l'échantillon global, mais sur 9 analyses de 76 individus.

Afin que les sacs viscéraux ne puissent intervenir par leur propre teneur en lipides et que les résultats soient comparables à ceux de l'échantillon précédent, les Sacculines externes ont été sectionnées aux ciseaux.

Les valeurs obtenues sont consignées dans le tableau VI ci-dessous.

Elles sont représentées graphiquement par la figure 6, page 46, où la ligne de régression des différents points est donnée par l'équation :

$$y = 0,1021 x + 6,2506$$

TABLEAU VI
*Données numériques relatives
aux dosages des acides-gras chez 76 Carcinus maenas ♂
portant ou ayant porté une Sacculine externe*

Numéro Analyse	Taille (mm)	Fréquences par classe de taille	Poids sec moyen (g)	% lipides /		% de chitine sèche	Larg. moy. des Sacculines (mm)
				Poids sec total	Poids sec total - chitine		
110	23 22	2 2	1,365	3,77	4,32	12,75	2,00
111	21 20	2 4	0,997	3,75	4,34	13,42	2,50
112	19	7	0,842	4,01	4,63	13,32	2,28
113	18	8	0,788	5,84	6,64	11,98	2,40
114	17	9	0,616	4,05	4,72	14,16	4,00
115	16	8	0,800	4,62	5,18	10,74	3,40
116	15	12	0,471	5,24	6,15	14,79	1,85
117	13	11	0,362	4,39	5,02	12,48	2,82
118	12 11	8 3	0,273	5,02	5,77	12,95	3,33

Le taux lipidique moyen pour la totalité de ces Crabes est de 4,52 % avec un écart-type de 0,62 et une erreur-standard de 0,24.

Si cette moyenne est comparée à celle obtenue avec les Crabes ♂ sans Sacculine externe (3,60 %), le calcul statistique montre que la différence est significative. En effet, la valeur expérimentale $t = 3,65$ est nettement supérieure à celle des tables ($t = 2,110$).

Il en résulte donc que les Crabes ♂ d'une taille égale ou inférieure à 23 mm et portant une Sacculine externe ont une teneur en matières grasses supérieure à celle des Crabes ♂ de même taille, mais dépourvus de Sacculine externe. Cette augmentation n'est pas due à la teneur propre en lipides des sacs viscéraux, puisque ceux-ci ont été enlevés. Tout se passe comme si, au moment de l'émergence du parasite, il se produisait une augmentation du taux lipidique de l'hôte.

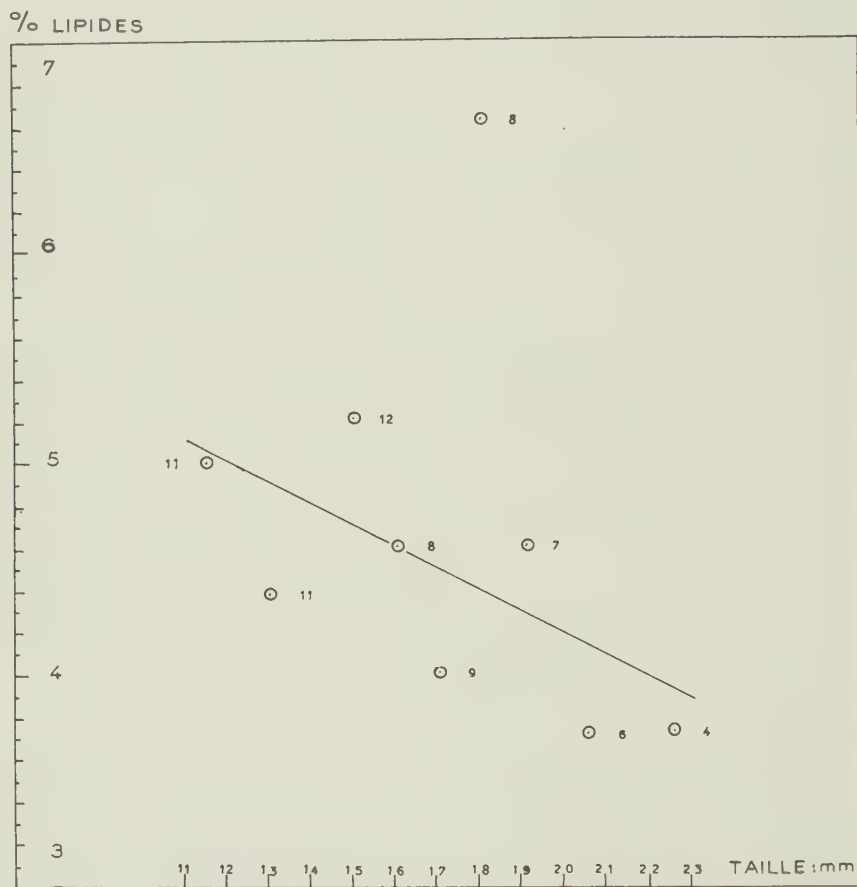


FIG. 6. — Variations du taux des lipides par rapport à la taille chez 76 Crabes ♂ portant ou ayant porté une Sacculine externe. Ligne de régression (Chaque point est accompagné du nombre d'individus dont il représente le pourcentage moyen).

c) Avec Sacculine externe bien développée.

Pour compléter les résultats précédents, nous avons recherché la teneur en lipides de Crabes ♂ plus âgés et portant des Sacculines plus développées (13 à 19 mm).

Quatre analyses ont été effectuées sur huit mâles à Sacculine externe, en provenance de l'Etang de Thau où ils ont été pêchés en décembre 1951. Les renseignements concernant cet échantillon figurent dans le tableau VII (page 47).

TABLEAU VII

Numéro Analyse	Taille (mm)	Fréquences	Poids sec moyen (g)	% lipides /		% de chitine sèche	Larg. moy. des Sacculines (mm)
				Poids sec total	Poids sec total - chitine		
183	27	2	2,622	3,64	4,09	11,15	16,00
184	28	2	3,089	3,37	3,80	11,34	18,50
185	29	2	2,860	3,55	4,04	12,31	14,00
186	30	2	3,717	4,34	4,92	11,63	15,50

Les résultats calculés sont les suivants :

% moyen de lipides = 3,72 ; écart-type = 0,39.

% moyen de lipides par rapport au poids sec total diminué de la chitine = 4,21.

La comparaison du taux lipidique moyen de ces animaux avec celui des mâles sans Sacculine externe (3,60 %) montre qu'il n'en diffère pas d'une manière significative. Il en ressort que les Crabes ♂ de 27 à 30 mm, porteurs de Sacculines externes bien développées, ne sont pas plus riches en matières grasses que les mâles plus petits n'ayant qu'un parasite interne.

Ces résultats incitent à penser que ce n'est que temporairement, au moment de la sortie du sac viscéral, qu'il y a une augmentation du taux lipidique des Crabes et qu'après cette altération passagère, ce taux redevient normal. Mais nous ne voyons là qu'une indication qui demanderait à être confirmée par d'autres essais, et non une conclusion définitive.

2. — *Crabes* ♀

a) *Sans Sacculine externe.*

31 analyses ont été exécutées sur 791 Crabes ♀ de 5 à 25 mm, ne présentant pas de Sacculine externe et pêchés en même temps que les Crabes ♂.

Le tableau VIII (page 48) donne les valeurs numériques relatives à cet échantillon.

Le taux moyen des lipides par rapport au poids sec total pour l'ensemble de ces animaux est de 4,28 % avec un écart-type de 0,61 et une erreur-standard de 0,11. Ce pourcentage, rapporté au poids sec total diminué de la chitine, est de 4,88 %.

La comparaison statistique de la teneur en lipides de ces femelles avec celle du groupe homologue ♂ (3,57 %) montre que le taux des femelles est significativement supérieur à celui des mâles.

Avant toute interprétation de ces faits, il faut se souvenir que les deux échantillons se composent d'une proportion relativement faible d'animaux indemnes (environ 10 %) et que les autres sont sacculinés. On peut donc, sans erreur excessive, les considérer comme des lots de Crabes parasités et conclure que les femelles à parasite interne sont plus riches en matières grasses que les mâles présentant les mêmes caractéristiques. Les deux groupes étant victimes du même phénomène pathologique, nous inclinons à penser

TABLEAU VIII

*Données numériques relatives
aux dosages d'acides-gras chez 791 Carcinus maenas ♀
sans Sacculine externe*

Numéro d'analyse	Taille (mm)	Fréquences		Poids sec moyen par de taille (g)	% lipides /		% de chitine sèche
		par analyse	par classe de taille		Poids sec total	Poids sec total - chitine	
187	25	2	2	1,394	2,90	3,33	12,76
188	23	3	3	0,951	3,36	3,88	13,24
189	22	3	6	1,053	4,81	5,50	12,35
190	22	3					
191	21	9	9	0,880	4,22	4,91	14,17
192	20	10	10	0,768	3,50	4,32	13,79
193	19	10	34	0,727	3,59	4,15	13,42
194	19	12					
195	19	12					
196	18	20	40	0,627	3,92	4,46	12,10
197	18	20					
198	17	22	70	0,529	4,41	5,04	12,56
199	17	24					
200	17	24					
201	16	25	80	0,452	4,12	4,71	12,50
202	16	25					
203	16	30					
204	15	30	85	0,394	4,87	5,52	11,69
205	15	30					
206	15	25					
207	14	35	70	0,328	4,58	5,20	11,95
208	14	35					
209	13	36	72	0,258	4,82	5,50	12,39
210	13	36					
211	12	32	71	0,244	4,57	5,13	10,51
212	12	39					
213	11	54	54	0,159	4,73	5,35	11,62
214	10	53	53	0,123	4,39	4,71	12,00
215	9	47	47	0,092	4,47	5,05	11,51
216	8	46	46	0,062	4,38	4,96	11,69
217	7	28	39	0,037	4,37	5,01	12,64
	6	9					
	5	2					

que la différence constatée pour les taux lipidiques est due à une différence de métabolisme des deux sexes, plutôt qu'à une divergence du mode d'action du parasite. Ce point de vue sera confirmé par les analyses ultérieures.

Celles-ci ont été faites, non plus sur des échantillons de Crabes pêchés dans l'Etang de Thau, au mois d'août, mais sur des animaux originaires de la même localité et récoltés en décembre 1951. Elles intéressent des lots d'importance numérique moindre, mais les tests statistiques auxquels elles ont été soumises tiennent compte de cette réduction d'effectifs, ce qui leur garde une entière validité.

b) *Avec Sacculine externe indemne.*

Pour ces animaux, le sac viscéral du parasite a été laissé en place et ses matières grasses sont comprises dans les résultats.

8 analyses ont été exécutées sur 16 Crabes ♀ de 25 à 27 mm, portant des Sacculines bien développées (3 à 16 mm). Les données numériques sont rassemblées dans le tableau IX ci-dessous.

Pour l'ensemble de ces Crabes, le taux moyen des lipides est de 3,93 % avec un écart-type de 1,21 et une erreur-standard de 0,46. Cette moyenne n'est pas significativement différente de celle des mâles indemnes de décembre 1951 (3,72 %). Le fait qu'elle paraisse légèrement supérieure à cette dernière va dans le sens des constatations déjà faites pour les mâles et les femelles à Sacculine externe.

La comparaison du taux moyen du présent échantillon avec celui des femelles sans Sacculine externe paraît difficile, car il ne s'agit pas d'animaux de la même époque et ayant la même taille.

TABLEAU IX

*Données numériques relatives aux dosages
des acides-gras chez 16 Carcinus maenas ♀
portant une Sacculine externe bien développée*

Numéro d'analyse	Taille (mm)	Fréquences	Poids sec moyen (g)	% lipides /		% de chitine sèche	Larg. moy. des Sacculines (mm)
				Poids sec total	Poids sec total - chitine		
163	25	2	2,056	4,20	4,72	10,94	14,50
164	26	2	2,450	1,63	1,84	11,12	12,00
165	27	2	2,932	4,77	5,34	10,67	15,50
166	28	2	3,575	5,91	6,60	10,34	8,00
167	33	2	5,036	4,49	5,03	10,73	15,33
168	33	2	4,524	3,51	3,89	9,72	12,50
169	35	2	5,558	2,79	3,80	12,31	13,00
170	37	2	6,610	4,15	4,61	10,90	8,00

Ces réserves faites, on peut cependant remarquer que les deux valeurs (4,28 et 3,93 %) ne sont pas significativement différentes et qu'il est donc possible que les deux groupes considérés soient semblables du point de vue de leur teneur en matières grasses.

c) Avec *Sacculine externe enlevée*.

Citons les résultats de 4 analyses faites sur 8 Crabes de 34 à 37 mm dont le sac viscéral a été intentionnellement sectionné (voir tableau X ci-dessous).

TABLEAU X

Numéro d'analyse	Taille (mm)	Fréquences	Poids sec moyen (g)	% lipides /		% de chitine sèche	Larg. moy. des Sacculines (mm)
				Poids sec total	Poids sec total - chitine		
179	34	2	5,512	2,83	3,23	12,39	11,56
180	35	2	5,533	3,81	4,38	12,90	12,00
181	36	2	6,418	4,19	4,79	12,43	12,50
182	37	2	7,489	3,81	4,29	11,52	16,50

Le taux moyen des lipides de ces animaux est de 3,66 % avec un écart-type de 0,50 et une erreur-standard de 0,29.

Le pourcentage trouvé n'est pas significativement différent de celui des femelles dont le parasite est resté en place (3,93 %). Le sac viscéral ne semble donc pas contenir de lipides dans des proportions telles qu'elles influent de façon sensible sur le taux général.

d) Femelles indemnes en vitellogenèse.

8 analyses ont été faites avec 16 femelles de 27 à 36 mm. Tous ces individus ont été contrôlés quant à l'absence de racines de *Sacculine*. Leurs ovaires étaient en pleine vitellogenèse. Les valeurs numériques sont reportées dans le tableau XI ci-dessous.

TABLEAU XI

Numéro d'analyse	Taille (mm)	Fréquences	Poids sec moyen (g)	% lipides /		% de chitine sèche
				Poids sec total	Poids sec total - chitine	
161	27	2	3,532	7,49	8,29	9,70
162	28	2	4,404	7,25	8,08	10,27
149	29-30	2	4,616	8,81	9,80	9,93
151	30	2	5,127	7,22	7,98	9,66
150	31	2	4,583	6,14	6,94	11,48
152	31	2	4,666	6,10	6,79	10,05
157	35	2	7,033	6,13	6,88	10,90
158	36	2	8,025	5,41	6,04	10,24

Les résultats ont été les suivants :

Taux lipidique moyen = 6,82 % ; écart-type = 1,04 ; erreur-standard = 0,3.

En les comparant avec les chiffres correspondant à ceux des 791 femelles du mois d'août, lesquelles, de par leur taille, ne pouvaient déjà être en vitellogenèse, on est frappé par une différence de 2,62 %, nettement significative.

L'ovogenèse est donc, pour la femelle de *Carcinus maenas*, un phénomène physiologique qui provoque une augmentation de plus de moitié du métabolisme lipidique. On se souvient que, par contre, une telle différence n'existe pas entre les femelles à parasite interne et celles portant des sacs viscéraux. Donc, en dépit des suppositions de SMITH, ovogenèse et parasitisme ne sont pas des phénomènes comparables du point de vue de leurs répercussions sur le métabolisme lipidique des Crabes. L'ovogenèse provoque une augmentation considérable du taux des matières grasses, alors que le développement de Sacculines externes n'en produit pas, sauf peut-être — mais ceci d'une manière encore hypothétique — au moment même de l'évagination du sac viscéral.

e) *Femelles indemnes et ovigères.*

Ce qualificatif désigne des femelles ayant pondu et portant leurs œufs fixés aux pléopodes. Ces œufs ont été laissés en place pour l'analyse.

Seize de ces femelles, de 29 à 37 mm, ont permis 8 dosages dont les résultats figurent au tableau XII ci-dessous.

Le taux lipidique moyen de ces animaux est de 5,5 %, avec un écart-type de 1,06 et une erreur-standard de 0,4.

Le taux lipidique moyen par rapport au poids sec total diminué de la chitine s'élève à 6,17 %.

Le pourcentage de matières grasses de ces Crabes est significativement supérieur à celui des femelles chez lesquelles la maturation des ovules n'a pas encore débuté (4,28 %). S'il paraît inférieur à celui des femelles en vitellogenèse dont les ovules sont encore internes, c'est sans doute parce que, lors de la ponte, tous les œufs ne sont pas fixés par les pléopodes ou que, par la suite, un certain nombre d'entre eux sont mécaniquement détachés.

TABLEAU XII

*Données numériques relatives aux dosages
des acides-gras chez 16 Carcinus maenas ♀
ovigères*

Numéro d'analyse	Taille (mm)	Fréquences	Poids sec moyen (g)	% lipides /		% de chitine sèche
				Poids sec total	Poids sec total - chitine	
171	29	2	4,291	6,57	7,31	10,13
159	30	2	4,199	4,61	5,22	11,71
160	31	2	5,115	6,25	7,04	11,21
155	33	2	6,004	6,68	7,48	10,72
156	34	2	6,169	4,12	4,68	11,93
172	35	2	6,237	4,79	5,40	11,15
173	36	2	7,760	6,67	7,39	9,95
174	37	2	7,907	4,31	4,88	11,75

f) *Femelles indemnes, ovigères, à ponte enlevée.*

Pour avoir une idée de la part qui revient aux œufs dans la teneur en matières grasses des femelles ovigères, nous avons fait 8 analyses sur 16 femelles de 29 à 35 mm dont la ponte a été détachée de l'abdomen par grattage.

Calculé à partir des données du tableau XIII (page 53), le taux lipidique moyen de cet échantillon est de 2,45 % avec un écart-type de 0,71 et une erreur-standard de 0,27. Par rapport au poids sec total diminué de la chitine, ce taux lipidique moyen s'élève à 2,85 %.

Le pourcentage de 2,45 est inférieur, de façon significative, à celui des femelles ovigères et cela n'a rien de surprenant. Il nous apprend que les œufs représentent une part fort importante des matières grasses de la femelle. Le fait qu'il soit également inférieur au taux des femelles en vitellogenèse et même au taux des femelles qui n'ont encore aucune activité sexuelle, montre que l'ovogenèse et la ponte provoquent un appauvrissement considérable en lipides du milieu intérieur et des organes.

Or, un tel appauvrissement n'a pas été constaté chez les femelles portant une Sacculine externe, ce qui confirme notre point de vue selon lequel ovaires et Sacculine n'ont pas une action identique sur le métabolisme lipidique de *Carcinus maenas*.

D. — **Conclusions.**

Les essais que nous venons de décrire représentent une somme considérable de mensurations, de classifications, d'analyses chimiques et de calculs statistiques. Mais ce labeur se justifie, car, ne craignons pas de le répéter, dans ce domaine, seules des recherches faites sur des échantillons importants d'animaux caractérisés avec précision peuvent avoir quelque chance de validité. Ce n'est pas sur quelques individus récoltés au hasard et dont on ne sait ni la taille, ni les conditions physiologiques, que peuvent être fondées des conclusions sérieuses.

De l'ensemble des chiffres obtenus et résumés dans le tableau XIV (page 53), on peut tirer les conclusions suivantes :

Chez *Carcinus maenas*, la teneur en lipides de l'animal complet évaluée par rapport à son poids sec total, est plus grande chez les femelles que chez les mâles, même lorsque ces femelles n'ont pas encore commencé leur vitellogenèse. Cette différence est donc caractéristique d'un métabolisme particulier dans chaque sexe. D'abord relativement modérée, elle devient considérable lorsque les femelles édifient leurs ovules et les pondent. La vitellogenèse demande en effet la synthèse d'une quantité importante de matières grasses qui sont temporairement emmagasinées dans les ovules et quittent l'animal au moment de la ponte. Après celle-ci, les femelles sont très pauvres en lipides.

Le parasitisme du Crabe par la Sacculine ne modifie pas significativement la teneur en graisses de l'hôte, sauf peut-être au moment de la sortie du sac viscéral et de la première croissance de celui-ci. En tout cas, une telle différence n'existe jamais chez les mâles porteurs d'un parasite interne. Du point de vue quantitatif, le métabolisme lipidique ne peut donc être à l'origine de la modification des caractères sexuels externes ♂. Ces caractères sont en effet souvent féminisés au maximum sans que soit décelable la moindre augmentation du taux lipidique. Le calcul montre qu'il n'y a aucune corréla-

TABLEAU XIII

*Données numériques relatives aux dosages
des acides-gras chez 16 Carcinus maenas ♀
démunis de leurs pontes*

Numéro d'analyse	Taille (mm).	Fréquences	Poids sec moyen (g)	% lipides /		% de chitine sèche
				Poids sec total	Poids sec total - chitine	
153	29	2	3.402	3,33	3,86	13,68
175	29	2	3.399	2,64	3,05	13,35
147	29-30	2	3.553	2,36	2,74	13,85
154	31	2	3.992	1,81	2,10	13,66
176	31	2	3.731	1,69	1,99	14,99
148	31-32	2	4.088	1,54	1,78	13,33
177	32	2	4.556	3,72	4,33	14,08
178	35	2	5.533	2,51	2,97	12,97

TABLEAU XIV

Récapitulation des résultats analytiques

Caractéristiques des échantillons	Nombre		% lipides / poids sec total	Ecart-type	Erreur- standard
	d'analyses	d'animaux			
Crabes ♂					
Sans Sacculine ext.	96	971	3,57	0,32	0,08
Avec Sacculine ext. jeune	9	76	4,52	0,62	0,24
Avec Sacculine ext. bien développée	4	8	3,72	0,39	0,13
Crabes ♀					
Sans Sacculine ext.	31	791	4,28	0,61	0,11
Avec Sacculine ext. indemne ...	8	16	3,93	1,21	0,46
Avec Sacculine ext. enlevée	4	8	3,66	0,50	0,29
Indemnes, en vitellogénèse	8	16	6,82	1,04	0,39
Indemnes et ovigères	8	16	5,50	1,06	0,40
Indemnes, ovigères, à ponte enlevée	8	16	2,45	0,71	0,27

tion entre la teneur en matière grasse des animaux ♂ sacculinés et leur degré de féminisation. L'hypothèse de SMITH ne correspond pas à la réalité des faits. S'il est bien exact que la vitellogenèse représente une stimulation de la synthèse lipidique, il n'en est pas de même pour la Sacculine.

L'origine de la féminisation des mâles sacculinés doit être recherchée ailleurs. Pour l'instant, elle reste mystérieuse. Les analyses ont montré que l'amplitude de ces transformations est indépendante du développement du parasite, de sa taille. A la lumière de la découverte récente de la glande androgène, on peut penser que celle-ci, d'une manière ou d'une autre, est impliquée dans le phénomène. Le mécanisme précis de cette intervention reste cependant inconnu. La dissection de nombreux Crabes sacculinés nous a montré qu'une action traumatique directe des racines du parasite sur les glandes n'est pas en cause. Et pourtant, des faits qu'une telle action aurait pu éclaircir restent inexplicables. N'est-il pas curieux de constater, par exemple, que de nombreux Crabes ♂ sont très féminisés bien que le système radiculaire de leur parasite soit très réduit, alors que d'autres, littéralement envahis par un réseau dense et ramifié, le sont beaucoup moins ? N'est-il pas étonnant d'observer que certains abdomens ♂ peu élargis abritent un ou plusieurs sacs viscéraux de grande taille, alors que d'autres sont entièrement segmentés et typiquement femelles, bien que leur Sacculine ne soit qu'interne ? Supposer que chez les individus très envahis, mais peu transformés, le hasard du développement radiculaire a épargné la région androgène ou ne l'a atteinte qu'à une époque où elle était moins sensible à son action, eut été une explication simple. Malheureusement, jusqu'à présent, l'observation anatomique est en contradiction avec cette hypothèse. Il est probable que c'est au niveau de la synthèse ou de la dégradation des substances hormonales en cause qu'il faudra rechercher la clé du problème. Mais ici, rien de définitif ne pourra être fait tant que ces substances n'auront pas été isolées et identifiées.

Nous ne voudrions pas terminer ce chapitre sans avoir souligné que, si nous réfutons la théorie de SMITH pour les raisons qui viennent d'être énoncées, nous n'en apprécions pas moins et dans toute sa valeur, le travail, les réflexions qui lui ont donné naissance. Il ne faut pas oublier en effet que ces travaux datent du début du siècle, d'une époque donc, à laquelle l'hormonologie sexuelle n'en était qu'à ses tout premiers débuts. La tentative qu'ils représentent de trouver un mécanisme biochimique à la détermination des caractères sexuels secondaires des Crustacés fait figure de travail précurseur. L'essor prodigieux qu'a connu la science des hormones dans les décades ultérieures montre que si cette voie n'a pas conduit au succès en ce qui concerne les Crustacés, elle n'en était pas moins orientée dans la bonne direction.

CHAPITRE III

RECHERCHES HORMONALES CHEZ *CARCINUS MAENAS*

Soupçonnée depuis longtemps, la nature hormonale du déterminisme des caractères sexuels externes des Crustacés est devenue une certitude depuis la découverte de la glande androgène. Déjà avant cette découverte, nous avons entrepris un certain nombre d'essais pour obtenir des précisions sur l'identité des substances pouvant être en cause.

Cinq sortes d'expériences ont été réalisées :

- 1° Recherche de substances stéroïdes dans l'hémolymph et dans divers organes de *Carcinus maenas* ;
- 2° Injections d'hormones de Vertébrés ;
- 3° Injections d'extraits de Sacculine ;
- 4° Injections de sérum de Crabes sacculinés ;
- 5° Alimentation des animaux avec des Sacculines.

I. — RECHERCHE DE SUBSTANCES STEROIDES

A. — **But poursuivi.**

Depuis plus de trente ans déjà, les recherches sur la sexualité des Vertébrés ont été couronnées de succès par l'isolement et la caractérisation chimique des hormones sexuelles.

En 1920, A. BUTENANDT et E. A. DOISY parviennent à extraire l'oestrone de l'urine de femme enceinte. L'obtention des hormones ♂ est un peu plus laborieuse et ce n'est qu'en 1935 que E. LAQUEUR isole la testostérone du testicule. Depuis, d'innombrables tra-

vaux ont permis d'identifier et d'étudier l'action physiologique de toute une série de corps dont la structure est à présent connue et qui ont un effet androgène et oestrogène.

Chez les Crustacés, par contre, les connaissances dans ce domaine sont à peu près nulles.

A défaut d'autres indications, il est donc naturel de se demander si les substances ayant une activité sexuelle chez les Vertébrés se retrouvent chez les Crustacés. Les seules recherches orientées dans ce sens sont dues à J. K. DONAHUE et encore, ne concernent-elles que d'éventuelles hormones ♀ caractérisées par des méthodes chimiques et biologiques.

Dans des travaux publiés en 1948 et 1949, cet auteur décrit l'extraction de substances oestrogènes à partir des œufs de *Homarus americanus*. Ces extraits purifiés sont dosés par fluorimétrie et chaque millilitre de leur solution dans le toluène révèle une activité oestrogène de 30 à 50 unités internationales. Une filtration plus poussée de la fluorescence réduit cette activité à 5 U. I. Parallèlement, l'estimation biologique sur Rates castrées, par injections ou applications vaginales, donne aussi une réponse positive et du même ordre de grandeur.

L'activité oestrogène des pontes de Homard ne fait donc pas de doute. Reste à savoir si les substances ainsi manifestées sont des oestrogènes vrais ou simplement des oestroïdes mimant une action oestrogène.

A côté de ces essais limités concernant les femelles, aucun travail concernant les mâles ne nous est connu. Nous avons donc pensé que, même si les résultats devaient rester négatifs, il serait utile de répondre une fois pour toutes à cette question en ce qui concerne *Carcinus maenas*.

On sait que les hormones mâles des Vertébrés ont une structure stéroïde et que nombre d'entre elles sont des 17-cétostéroïdes dérivés de l'étiocolane. Il en est ainsi pour l'androstérone et la déhydro-isoandrostérone. En biologie clinique, le dosage de ces hormones est pratiqué couramment et nous avons profité de notre expérience de cette technique pour rechercher l'existence de telles substances dans l'organisme du Crabe. Nous nous sommes adressé successivement aux testicules, à l'hémolymphe et à l'hépatopan-créas.

D'une part, nous avons pratiqué la recherche des 17-cétostéroïdes totaux telle qu'elle se fait en biologie humaine et, d'autre part, nous avons procédé au fractionnement chromatographique de l'extrait global. L'emploi de ces méthodes a fourni l'occasion de leur apporter certaines améliorations techniques qu'il paraît utile de signaler.

B. — Recherche des 17-Cétostéroïdes totaux.

1. Principe.

Le liquide biologique ou les organes à analyser sont soumis à chaud à une hydrolyse chlorhydrique destinée à libérer les stéroïdes d'éventuelles combinaisons susceptibles de les masquer. L'hydrolysat est extrait plusieurs fois à l'éther qui dissout un certain nombre de corps organiques, dont les stéroïdes. L'extrait-éther est lavé au bicarbonate de soude et à la soude, afin d'éliminer les phénolstéroïdes, donc les oestrogènes. Après

lavage à l'eau, l'éther est déshydraté au sulfate de sodium, puis évaporé sous pression réduite. Dans l'extrait sec ainsi obtenu, on peut mettre en évidence les 17-cétostéroïdes par la réaction de Zimmermann. Celle-ci est basée sur le développement d'une coloration rouge-violet en présence de métadinitrobenzène en solution potassique.

2. Préparation du matériel.

a) Testicules.

Les testicules sont prélevés après dissection sommaire du bouclier céphalothoracique dorsal sur 79 Crabes ♂ de très grande taille (50-60 mm). Les parties facilement accessibles des gonoductes ont été jointes à l'ensemble, mais il n'est pas certain que la glande androgène qui, à l'époque de ces essais, n'avait pas encore été localisée chez *Carcinus maenas*, ait fait partie des prélèvements.

Pour éviter toute altération, les organes sont recueillis sur glace et conservés à -10°C jusqu'au moment de l'analyse.

b) Hémolymph.

Fournie par les 79 Crabes précédents avant leur dissection, elle est recueillie d'abord par ponction à la seringue puis, plus rapidement et en série, par aspiration à la trompe, grâce au dispositif schématisé dans la figure 7 (page). Celui-ci comprend : une aiguille métallique de 0,8/40 mm, montée sur tuyau de polyéthylène transparent d'un diamètre intérieur de 3 mm ; un flacon à trois tubulures branché sur une trompe à eau et muni d'un robinet R servant à régler l'aspiration ; un erlenmeyer de recueil de 300 cc. Cette installation permet de prélever très rapidement l'hémolymph en piquant les Crabes à l'articulation basale des pattes locomotrices et en maintenant l'aiguille jusqu'à épuisement du milieu intérieur. Les prises successives s'accumulent automatiquement dans le récipient de recueil sans aucune manipulation. Il est toutefois recommandé de ne pas créer de dépression trop brutale, celle-ci étant susceptible de faire éclater le tube digestif et de souiller ainsi l'hémolymph.

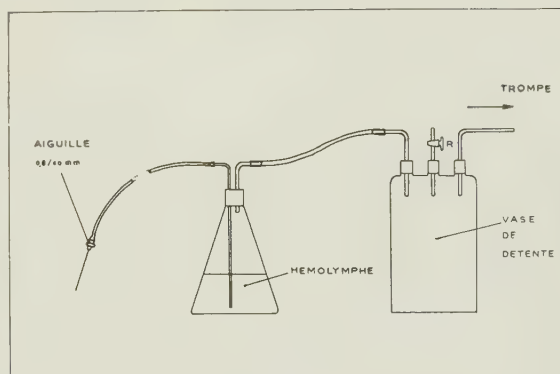


FIG. 7. — Schéma d'un montage pour prises, en série, d'hémolymph chez les Crabes.

Les 79 Crabes traités ont donné 256 ml d'hémolymph qui ont été conservés à -10°C .

Notons que, sous une grande épaisseur, l'hémolymph n'a plus la teinte bleutée habituelle, mais devient franchement noirâtre.

c) Hépatopancréas.

Ces glandes ont été fournies par le même lot de Crabes en procédant comme pour les testicules. La conservation a été identique.

3. *Hydrolyse.*

Testicules et hépato-pancréas sont homogénéisés dans un broyeur Turmix après addition de 100 ml d'eau distillée. La bouillie obtenue est complétée dans chaque cas à 500 ml par de l'eau distillée. Les 256 ml d'hémolymphes sont ajustés au même volume.

Après addition de 50 ml d'acide chlorhydrique pur, chaque liquide ou suspension est soumis pendant quinze minutes à une ébullition sous reflux par réfrigérant.

4. *Extraction.*

Après un refroidissement rapide, chaque hydrolysats est extrait trois fois par 200 ml d'éther sulfurique, sur tapis roulant, dans des allonges cylindriques de un litre.

5. *Lavages.*

Les trois fractions éther réunies sont lavées successivement par :

- 50 ml de CO_2NH_4 saturé, pendant dix minutes ;
- trois fois 50 ml de NaOH à 10 %, pendant dix minutes ;
- trois fois 50 ml d'eau distillée, pendant dix minutes.

Après le dernier lavage à l'eau, la réaction de l'éther doit être voisine de la neutralité.

6. *Dessiccation.*

L'extrait lavé et neutre est déshydraté par addition d'une pincée de SO_4Na_2 anhydre, puis filtré sur coton de verre et SO_4Na_2 anhydre. L'éther est ensuite évaporé sous pression réduite et réfrigérant, au bain-marie à 45° C. Lorsqu'il se trouve réduit à un volume de 2 ou 3 ml, il est transvasé dans un bécher de 50 ml et amené à siccité par évaporation à l'air libre, dans le même bain-marie. L'extrait ainsi obtenu se conserve bien en atmosphère sèche, sous vide.

7. *Réaction de caractérisation*

On applique la réaction de Zimmermann.

Le résidu sec est repris par 2 ml d'alcool absolu. A 0,5 ml de cette solution, on ajoute 0,5 ml d'une solution alcoolique de potasse (1 ml d'eau distillée + 1,68 g de KOH pur + 14 ml d'alcool absolu) et 0,5 ml d'une solution de métadinitrobenzène pur, recristallisé, à 1 % dans l'alcool absolu. La réaction se développe pendant 45 minutes au bain-marie à 37° C, à l'obscurité. Un témoin des réactifs, obtenu en remplaçant la solution d'extrait par 0,5 ml d'alcool absolu donne la coloration propre des réactifs.

8. *Résultats.*

a) *Testicules.*

L'extraction de leur hydrolysats donne une solution jaune dont la dessiccation laisse un résidu sec de même teinte. Celui-ci fournit avec le métadinitrobenzène une coloration rouge foncé très nette, alors que le témoin ne se colore que faiblement.

L'extrait testiculaire renferme donc des substances qui réagissent avec des composés aromatiques dinitrés, mais il ne semble pas qu'il s'agisse de 17-cétostéroïdes, car on ne discerne pas la coloration violette caractéristique de ces substances.

Nous avons pensé que les caroténoïdes, si abondants dans l'organisme de *Carcinus maenas*, pouvaient jouer un rôle dans la réaction et nous avons appliqué la réaction de Zimmermann à un échantillon de β -carotène pur aimablement fourni par R. LENEL. La coloration rouge ne s'est pas développée.

Il est aussi permis de supposer que, dans cet essai, une coloration violette faible, mais caractéristique des 17-cétostéroïdes, peut être masquée par des chromogènes parasites trop abondants. Nous avons donc été amené à tenter le fractionnement chromatographique que nous décrirons par la suite.

b) *Hémolymphes*.

L'acidification de l'hémolymphes par l'acide chlorhydrique provoque naturellement une précipitation abondante des protéines sous forme d'un coagulum blanc qu'il est bon de réduire au Turmix pour assurer de meilleures conditions d'hydrolyse.

Les extractions à l'éther sont accompagnées de fortes émulsions qu'il faut détruire par centrifugation. Elles fournissent un extrait légèrement jaune dans lequel le premier lavage (CO_3HNa) fait apparaître des grumeaux jaunes à l'interface. Les lavages à la soude renforcent la teinte jaune de l'extrait qui, après dessiccation, donne un résidu jaune orange cristallisant sous forme de rosaces. La réaction au métadinitrobenzène fournit ici une coloration brune un peu plus foncée que celle du témoin, mais l'absence de coloration violette indique encore une fois l'absence de 17-cétostéroïdes.

c) *Hépatopancréas*.

L'extraction de l'hydrolysate chlorhydrique de ces organes à l'éther donne une solution brun rouge très foncé que le premier lavage au bicarbonate éclaircit beaucoup en donnant une hypophase très brune. L'intensité de cette coloration justifie deux nouveaux lavages avec le même produit. Ceux qui sont ensuite faits à la soude provoquent, dans la phase éther, l'apparition d'un précipité floconneux qui se sédimente peu à peu et que les lavages à l'eau distillée font disparaître.

La solution organique finale a une teinte jaune orange très marquée et sa dessiccation donne un extrait cireux abondant, de même couleur. Une fraction de celui-ci est soumise à la réaction de Zimmermann. Elle ne donne aucune coloration caractéristique, bien que la teinte du liquide de réaction soit un peu plus foncée que celle du tube témoin. Cet extrait ne paraît donc pas renfermer de 17-cétostéroïdes.

9. *Conclusions*.

La technique d'extraction et d'identification des 17-cétostéroïdes de l'urine humaine appliquée aux testicules, à l'hémolymphes et à l'hépatopancréas de *Carcinus maenas* ne permet pas de déceler de telles substances dans l'organisme de cet animal. Aucun des extraits ne donne la coloration rouge violet caractéristique des hormones présentant cette structure. Seul, le résidu obtenu à partir d'un broyat de testicule fournit une coloration brun rouge foncé. Il ne s'agit pas en l'occurrence des quinones qui peuvent résulter de

l'action de la potasse sur le métadinitrobenzène, puisque le témoin des réactifs ne les révèle pas. Nous ne savons rien de plus pour l'instant quant à la nature de la ou des substances qui sont à l'origine de cette coloration.

Afin d'être certain que cette coloration rouge, par son intensité, ne masque pas la teinte violette spécifique des 17-cétostéroïdes, nous avons essayé d'éliminer l'action d'éventuels chromogènes perturbateurs par un fractionnement chromatographique des extraits. Ce sont ces expériences qui, à présent, vont être décrites.

C. — Recherche de 17-Cétostéroïdes après fractionnement chromatographique.

La méthode utilisée est celle appliquée par J. BAUER (1952) à l'étude des 17-cétostéroïdes urinaires humains. Plusieurs perfectionnements lui ont été apportés en vue d'une grande rapidité et d'une maniabilité améliorée.

1. Principe.

L'extrait sec total obtenu par la méthode décrite plus haut est séparé en vingt-cinq fractions par chromatographie sur colonne d'alumine, à l'aide de cinq éluants de polarités croissantes. Sur chacune de ces fractions, évaporées à siccité, on procède à une colorimétrie au métadinitrobenzène.

2. Mode opératoire.

a) La colonne.

La colonne chromatographique est obtenue par voie humide en versant peu à peu dans un tube de verre de 150 mm de long et d'un diamètre intérieur de 8 mm, muni à la base d'un robinet, garni d'un tampon de coton et chargé de 4 ml de tétrachlorure de carbone R. P., 3 g d'alumine standardisée de Brockmann (Merck) conservée à l'abri de toute humidité. L'alumine se tasse de façon très homogène si l'on prend la précaution de tapoter la colonne pendant toute la durée du versage. L'ouverture du robinet inférieur permet l'écoulement du volant de CCl_4 qui surmonte l'alumine dans un premier tube à essai jaugé à 15 ml.

L'extrait à chromatographier est alors repris par un ml de tétrachlorure et versé avec précaution sur la colonne, par écoulement le long de la paroi du tube, en évitant tout remous de l'alumine. Un nouvel écoulement amène le niveau du liquide à fleur de la surface de l'adsorbant. Il est important que la phase solide ne soit jamais découverte. Les restes de l'extrait sont repris par un deuxième ml de CCl_4 qui rejoint le premier dans les mêmes conditions. De la sorte, la totalité de l'extrait se fixe en un anneau coloré à la surface de l'alumine. Pour éviter toute perturbation de la stratification de celle-ci lors des versages ultérieurs, il est bon de placer un tampon de coton brise-jet dans la partie libre de la lumière du tube.

La quantité de tétrachlorure ($4 + 1 + 1$ ml) a été calculée pour que la première fraction recueillie soit, avec les dix premiers millilitres d'éluant, de 15 ml. Un millilitre environ du liquide reste en effet toujours fixé sur l'alumine. Les vingt-quatre tubes suivants sont tous jaugés à 10 ml.

b) *L'éluion.*

L'extrait fixé sur la colonne est successivement élué par :

- 5 fois 10 ml de CCl_4 pur ;
- 5 fois 10 ml de CCl_4 pur à 10 % d'éther sulfurique ;
- 5 fois 10 ml de CCl_4 pur à 30 % d'éther sulfurique ;
- 5 fois 10 ml d'éther sulfurique pur ;
- 5 fois 10 ml de méthanol pur.

La polarité croissante de ces liquides permet de détacher de l'alumine des substances de plus en plus fortement absorbées.

Du point de vue pratique, nous avons réalisé un dispositif qui permet la succession des différents éluants sans aucune interruption du flux liquide. A l'écoulement par aspiration sous pression réduite pratiqué par J. BAUER — procédé qui doit volatiliser une partie notable des fractions les plus volatiles — nous avons préféré une éluion sous pression accrue. L'ensemble du dispositif est reproduit par la figure 8 ci-contre. Il comporte deux réservoirs à éluant gradués jusqu'à 50 ml par fractions de dix et se déversant dans la colonne par un tube commun. La surpression sur les liquides est provoquée en actionnant une poire de caoutchouc branchée sur un flacon de détente intermédiaire, grâce à une valve. Cette surpression peut être contrôlée par un manomètre à mercure. Un jeu de quatre robinets permet d'isoler chacun des réservoirs à éluant du reste du système, donc de les charger sans avoir à interrompre le flux dans la colonne. On peut de la sorte passer d'un éluant au suivant sans aucune discontinuité dans la chromatographie.

Deux ou trois de ces ensembles peuvent être branchés simultanément sur un même vase de détente, si bien qu'un seul opérateur peut suivre et régler sans difficulté trois chromatographies à la fois.

c) *Evaporation des fractions.*

L'évaporation des nombreuses fractions chromatographiques a toujours été un problème ardu et dispendieux en temps. Ses deux principaux écueils sont :

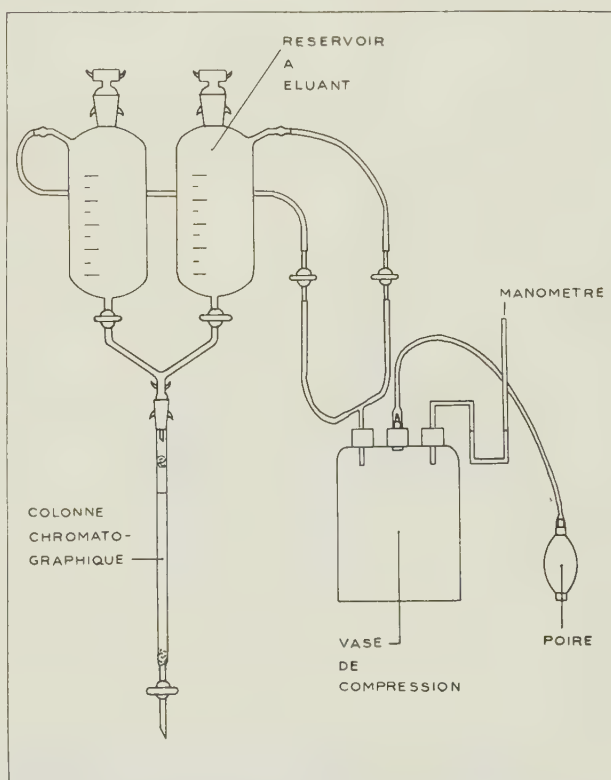


FIG. 8. — Schéma d'un dispositif pratique pour la chromatographie sur alumine des 17-cétostéroïdes.

- l'émission de vapeurs souvent nocives dans l'atmosphère du laboratoire ;
- la difficulté de contrôler avec précision la température de l'évaporation, d'où danger d'altération pour les substances thermolabiles.

Si le premier de ces écueils est évité dans certains évaporateurs à infra-rouges dans lesquels un ventilateur rejette à l'extérieur toutes les vapeurs, il n'en est pas de même pour le second. En effet, à moins d'un réglage empirique chaque fois à refaire, il n'est pas possible, dans ces appareils, de contrôler la température avec une précision suffisante.

Nous avons résolu le problème de la manière suivante (voir figure 9 ci-contre).

Deux millilitres de chacune des vingt-cinq fractions chromatographiques sont transvasés dans vingt-cinq tubes à essai de 60×16 mm placés dans des porte-tubes spéciaux. Deux de ces derniers, donc cinquante tubes au total, sont alors placés dans un bain-marie de précision réglé à la plus haute température compatible avec l'intégrité des extraits. Le bassin du bain-marie est clos par un couvercle métallique comportant deux chambres d'admission qui alimentent chacune vingt-cinq canules situées à la face inférieure. Les porte-tubes sont construits et les canules disposées de façon à ce que, grâce à un système de tige-guide du couvercle et de perforations des portoirs, chaque canule pénètre au centre de chaque tube, à quelques millimètres au-dessus du niveau du liquide. Un joint de caoutchouc mousse assure l'étanchéité du couvercle. Un compresseur alimente les deux chambres d'admission et envoie, par l'intermédiaire des canules, un courant d'air réglable à la surface du liquide de chaque tube. L'air et les vapeurs qu'il

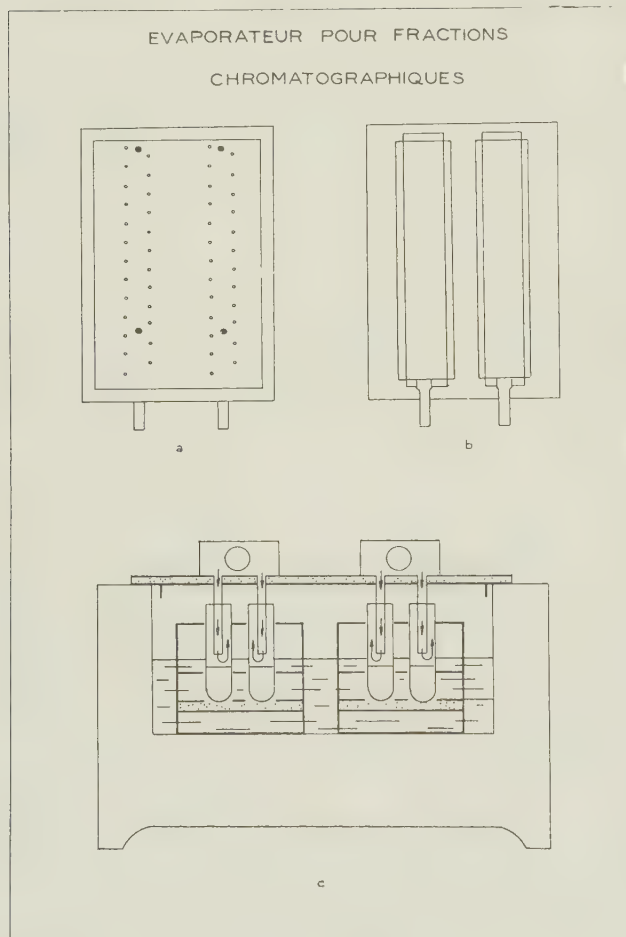


FIG. 9. — Schéma d'un dispositif pour l'évaporation rapide et contrôlée de nombreuses fractions chromatographiques, a) Face inférieure du couvercle soufflant ; b) Face supérieure ; c) Coupe transversale du bain-marie et du couvercle (échelle double de a) et b).

entraîne quittent le bassin clos du bain-marie par un orifice très large et sont rejetés hors du laboratoire par un gros conduit de caoutchouc. Il va de soi que l'air peut être remplacé, si une réactivité particulière des extraits l'exige, par un gaz inerte sous pression.

Ce dispositif (1) présente les avantages suivants :

- 1° Le thermostat du bain-marie permet un contrôle rigoureux de la température d'évaporation ;
- 2° Toutes les vapeurs nocives ou simplement malodorantes sont évacuées ;
- 3° Le courant gazeux permanent réduit beaucoup la durée de l'évaporation. Par exemple, 50 fractions de 2 ml d'alcool ou de tétrachlorure peuvent être évaporées, à 45° C, en vingt minutes seulement.

Nous avons conçu et calculé ce procédé pour la technique chromatographique que nous utilisons, mais il est clair que son principe pourrait être adapté à d'autres cas, notamment à des fractions plus nombreuses ou plus considérables.

d) *Colorimétrie.*

Le perfectionnement que nous venons de décrire permet de réaliser la colorimétrie dans les tubes mêmes où a eu lieu l'évaporation, sans avoir à redissoudre ou à transvaser les extraits secs.

Tous ces tubes ont en effet une hauteur identique et leur bord supérieur a été rodé suivant un plan perpendiculaire à l'axe du tube. Placés dans leur portoir, ils peuvent donc être clos de manière satisfaisante par simple apposition d'une glace épaisse, d'autant plus que la base des supports comporte un tapis de caoutchouc qui compense d'éventuelles inégalités de longueur.

Pour la colorimétrie, il suffit d'ajouter à chaque tube évaporé 0,2 ml d'alcool absolu, 0,2 ml de potasse alcoolique et 0,2 ml de métadinitrobenzène, de bien agiter l'ensemble pour une parfaite redissolution et de le placer, couvert, pendant quarante-cinq minutes, à l'obscurité, dans un bain-marie à 37° C.

Après ce délai, les tubes sont rapidement refroidis, puis le contenu de chacun d'eux est dilué avec 5 ml d'alcool à 96° et la lecture est faite au colorimètre tricellule Jobin et Yvon, à 520 m μ .

Dans l'interprétation des valeurs obtenues, il est nécessaire de tenir compte de témoins des réactifs et de la coloration propre des extraits. L'évaluation quantitative se fait grâce à une courbe d'étalonnage obtenue à partir de quatre dilutions d'une solution à un pour mille de déhydro-isoandrosterone.

3. *Résultats.*

a) *Testicules.*

L'extrait sec se dissout facilement dans le tétrachlorure en donnant une solution jaune. Dans la colonne, le pigment jaune se fixe sur les $\frac{3}{4}$ supérieurs de l'alumine pour y rester en majeure partie pendant toute la chromatographie. Une fraction en est cependant éluee avec les quinze premiers ml de tétrachlorure. Une autre portion est recueillie dans le tube 21.

(1) Construit par les Etablissements Chaix, 6, Avenue Milton, Nancy.

Quatre ml du contenu de chaque tube sont évaporés à siccité de même qu'une série de témoins. Des résidus secs importants, les uns cireux, les autres blancs et consistants, sont notés particulièrement dans les tubes 1 et 2 ; 6, 7 et 8 ; 21 et 22. Des dépôts moins importants et constitués par de fines gouttelettes jaune orange caractérisent les tubes 12 à

18. Ces observations montrent déjà que l'extrait global est hétérogène et renferme des substances diversement adsorbés par l'alumine.

Les résultats de la colorimétrie sont exprimés par la figure 10 a ci-contre. En abscisse sont portés les numéros des fractions et en ordonnée les valeurs lues sur le tambour du photocolorimètre pour chacune d'elles, compte tenu de la correction appliquée pour la coloration propre des extraits. Ces ordonnées concrétisent donc l'intensité de la coloration qui s'est développée au cours de la réaction. Etant donné que cette coloration n'a pas la nuance spécifique des 17-cétostéroïdes, nous n'avons pas jugé nécessaire de l'exprimer par rapport à des étalons de déhydro-isoandrosterone. Il faut la considérer simplement comme le témoin de la présence de substances réagissant avec les réactifs employés.

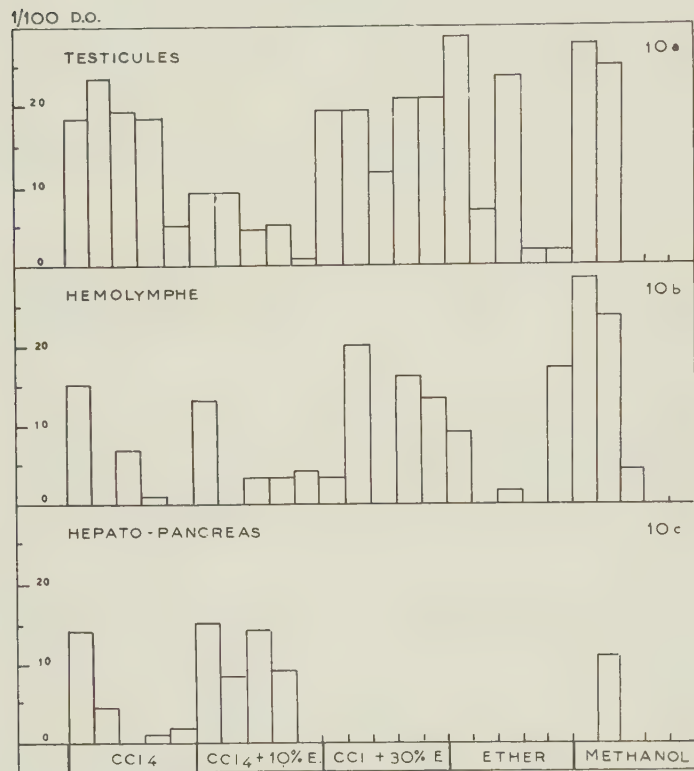


Fig. 10. - Chromatogrammes sur alumine des extraits neutres de testicules, d'hémolymph et d'hépatopancréas de Crabes (Réaction de Zimmermann).

Dans ces conditions, l'examen du graphique montre :

- un sommet important dans les éluats de tétrachlorure pur ;
- deux sommets moindres dans les fractions à 10 % d'éther ;
- deux sommets importants dans les éluats 11-12 et 14-15 ;
- deux sommets considérables en 16 et 18 (éther pur) ;
- un sommet également marqué en 21 et 22.

Nous ne savons actuellement rien quant à la nature de ces substances qui sont ici simplement caractérisées par leur degré d'adsorption sur l'alumine. De longues recherches seront encore nécessaires pour leur identification et un rôle physiologique ne pourra leur être attribué qu'après expérimentation sur le matériel vivant.

b) *Hémolymph*.

Ici encore, la totalité de l'extrait se dissout aisément dans le tétrachlorure et le pigment jaune se fixe sur le centimètre supérieur de la colonne d'alumine pour y rester immobile jusqu'à la fraction 21 dans laquelle il est partiellement élué.

Après évaporation du solvant, les résidus secs sont, dans l'ensemble, moins abondants qu'ils ne l'étaient avec les extraits de testicules. La colorimétrie, dont les résultats sont exprimés par la figure 10 b (page 64) confirme cette impression, car les clochers observés sont moins prononcés qu'en 10 a. Le second chromatogramme se distingue aussi du premier par l'absence d'un sommet net au niveau des fractions éther.

c) *Hépto-pancréas*.

En raison de l'abondance de l'extrait global obtenu, la chromatographie n'a été faite que sur une prise d'essai de 300 mg de substance qui, dans le tétrachlorure, donne une coloration rouge orange.

Contrairement à ce qui a été observé pour les extraits de testicules et d'hémolymph, les pigments de la solution se fixent à des niveaux différents sur la colonne d'alumine, montrant l'existence de plusieurs espèces chimiques. Après passage des premiers millilitres de solvant, on peut observer :

- une bande A rose orange, étroite, au sommet de la colonne ;
- une bande B rose orange, placée à 9 mm en dessous de la précédente ;
- une bande C plus nettement orange, située 16 mm sous A.

La partie inférieure de la colonne est colorée en jaune et ce pigment quitte l'alumine dès les premiers millilitres d'éluant. Après passage des quinze premiers millilitres de tétrachlorure, les bandes B et C s'étalent et se rejoignent presque. Le sommet de B se situe alors à 18 mm sous A et le sommet C à 29 mm sous A. La bande C commence à quitter la colonne à la fin du troisième tube de tétrachlorure pur, alors que B n'est élué que dans les trois premiers millilitres du sixième tube. Toutes les fractions suivantes restent incolores. La bande A s'atténue progressivement tout au long de la chromatographie, sans être éluee dans une fraction précise.

Après évaporation, le premier tube renferme un dépôt orange abondant, de même que le tube 6. Des résidus blanchâtres faibles se trouvent dans les tubes 11, 14 et 18. Ils sont plus abondants en 21 et 22.

Le chromatogramme c de la figure 10 (page 64) concrétise les résultats de la colorimétrie. Son observation montre que les substances réagissant avec le métadinitrobenzène sont beaucoup moins abondantes dans l'extrait d'hépto-pancréas que dans ceux des testicules et de l'hémolymph. On est en particulier frappé par l'absence totale de réactivité des fractions 11 à 20.

4. *Conclusions*.

Certains auteurs, tels D. B. CARLISLE et C. G. BUTLER (1956), F. G. W. KNOWLES et D. B. CARLISLE (1956) pensent, sans l'appui d'aucune preuve expérimentale, que l'hormone inhibitrice de la vitellogenèse chez la Crevette *Leander serratus* est de nature stéroïdique. Ils supposent, par analogie sans doute avec les glyco- et sulfo-conjugués des stéroïdes de l'urine des Vertébrés, que ces hormones sont liées à des protéines et forment ainsi composés hydrosolubles.

En ce qui concerne *Carcinus maenas*, les essais qui viennent d'être décrits permettent d'affirmer avec certitude qu'il n'existe dans les testicules, l'hémolymphes et l'hétopancréas des individus ♂ de cette espèce, aucun corps ayant une structure de 17-cétostéroïdes. La spécificité de la réaction de Zimmermann, dans les conditions d'extraction utilisées, nous autorise à être formel à ce sujet. L'emploi de la technique chromatographique écarte toute possibilité d'erreur due à un masquage de la coloration caractéristique par des chromogènes étrangers. On peut donc considérer comme établi que les hormones sexuelles ♂ du Crabe, ou leurs métabolites, n'ont pas la structure des hormones des Vertébrés. Elles devront donc être recherchées dans des catégories chimiques voisines ou, peut-être, tout à fait différentes.

Les chromatographies d'extraits neutres qui ont été réalisées montrent, dans l'hémolymphes et les testicules, la présence de plusieurs substances réagissant avec le méta-dinitrobenzène, substances dont certaines sont absentes des extraits d'hétopancréas. Leur nature reste à définir et il faut encore rechercher si elles ont une activité biologique quelconque. Ce ne sont là que de tout premiers pas vers l'identification des hormones sexuelles des Invertébrés.

II. — INJECTIONS D'HORMONES PURES DE VERTEBRES

En marge de la recherche d'hormones de type stéroïde, nous avons également voulu savoir si l'injection d'hormones pures de Vertébrés avait un relentissement quelconque sur la physiologie de *Carcinus maenas*. Nous avons donc introduit dans l'organisme des Crabes des substances aussi variées que les hormones gonadotropes, somatotropes, la déhydro-isoandrostérone, l'oestradiol et même l'hormone adrénocorticotrope (A.C.T.H.).

Des essais de ce genre ont déjà été réalisés sur d'autres Invertébrés, notamment les Echinodermes et les Insectes, avec d'autres hormones. La bibliographie détaillée en est donnée par P. LELU (1938). F. G. KNOWLES et D. B. CARLISLE (1956) signalent aussi que l'administration orale de méthyltestostérone ou d'autres hormones androgènes de Vertébrés à la Crevette *Leander serratus* reproduit, chez ces animaux, les effets de l'hormone inhibitrice de la vitellogénèse.

Bien que nos résultats soient restés négatifs, nous croyons devoir les signaler et en décrire les modalités.

A. — Hormones gonadotropes.

1. Technique.

A été utilisée une préparation injectable lyophilisée d'hormone gonadotrope du lobe antérieur de l'hypophyse (hormone Choay) (1). L'hormone sèche a été dissoute dans de l'eau de mer filtrée et stérilisée, de manière à obtenir une solution contenant 20 unités-rat par millilitre.

(1) Nous tenons à remercier les Laboratoires Choay, les Laboratoires Roussel et les Laboratoires Organon qui nous ont aimablement fourni les divers échantillons d'hormones.

Ont été injectés huit Crabes ♂ et huit Crabes ♀ de 24 à 33 mm, à raison de 0,25 ml de solution par injection. Au préalable, pour éviter toute surpression ou un reflux de liquide, une prise de 0,25 ml d'hémolymphe a été opérée sur chaque animal.

Chaque Crabe a ainsi reçu une première dose de 5 unités-rat, une seconde dose identique deux jours plus tard et une troisième après un repos de huit jours. Pour ces dernières injections, l'hormone Choay a été remplacée par 500 U.I. d'hormone gonadotrope chorionique Roussel.

Un nombre égal de témoins a reçu dans les mêmes conditions trois injection de 0,25 ml d'eau de mer stérile.

2. Résultats.

Deux Crabes ♂ et une femelle sont morts treize jours après la dernière injection hormonale. Tous les autres ont parfaitement survécu jusqu'à la date de la dissection, soit pendant trois semaines. Les animaux semblent donc bien supporter l'injection de ces protéines étrangères.

A la dissection, aucune différence de taille ou d'aspect n'a pu être constatée entre les testicules des mâles ayant reçu l'hormone gonadotrope et ceux des témoins. Toutes ces glandes étaient pleinement fonctionnelles et leurs conduits déférents bourrés de spermatophores.

Chez les femelles, les constatations ont été identiques et la vitellogenèse ne semble pas avoir été influencée de manière perceptible par les injections.

D'après ces essais, qui demanderaient à être prolongés dans le temps, étendus à un plus grand nombre d'animaux et contrôlés histologiquement, il ne semble donc pas que les gonades de *Carcinus maenas* soient sensibles à l'action des gonadotrophines de Vertébrés.

B. — Hormone somatotrope.

1. Technique.

Ces injections ont été faites pour déceler une action éventuelle de l'hormone somatotrope sur la mue ou la préparation à la mue des Crabes.

A été utilisée une préparation lyophilisée d'hormone somatotrope Choay dissoute dans l'eau de mer stérile à raison de 20 unités-rat Evans par ml.

Huit Crabes ♂ et huit femelles de 28 mm environ, tous au stade de repos physiologique C₄, ont reçu trois injections de 0,25 ml de solution, soit une activité de 5 unités-Evans chacune, à des intervalles de cinq à dix jours. Un nombre égal de témoins a reçu des quantités identiques d'eau de mer stérile.

2. Résultats.

Un Crabe ♂ est mort accidentellement lors de l'injection de la deuxième dose hormonale. Une femelle a péri quatre jours après réception de cette deuxième dose. Tous les autres animaux ont bien vécu pendant trois semaines. Ils ont alors été disséqués.

Aucun d'eux n'a présenté un signe quelconque de préparation à la mue et, à plus forte raison, aucun n'a mué.

Il ne semble donc pas, qu'administrée à cette dose et dans ces conditions de durée, l'hormone somatotrope de Vertébrés puisse déclencher le processus de préparation à la mue. Une étude plus approfondie demanderait des essais plus longs et un contrôle biochimique, en particulier de l'anabolisme protidique que cette hormone a le pouvoir d'exciter chez les Vertébrés.



C. — Hormone adrénocorticotrope hypophysaire (A. C. T. H.).

On ne connaît, chez les Crustacés, aucune glande jouant un rôle analogue aux corticossurrénales des Vertébrés. En soumettant *Carcinus maenas* à un traitement A. C. T. H., nous avons voulu savoir si ces animaux supportaient cette substance et si elle exerçait une influence sur leur organisme.

1. Technique.

L'hormone injectée a été une préparation lyophilisée d'A. C. T. H. Choay dissoute dans de l'eau de mer stérile à raison de 10 U. I. pour ml, soit 10 mg.

Les détails opératoires ont été les mêmes que dans les essais précédents.

2. Résultats.

Deux femelles et un mâle sont morts entre la première injection et la deuxième ; un témoin a subi le même sort. Tous les autres animaux ont bien résisté et aucun d'eux n'a présenté de particularité à la dissection.

Dans ces conditions, l'hormone A. C. T. H. ne paraît pas avoir une action léthale prononcée sur *Carcinus maenas*, ni d'influence macroscopiquement décelable sur l'organisme de ces animaux.

D. — Hormones androgènes.

1. Technique.

Nous nous sommes servi d'une déhydro-isoandrosterone cristallisée pure. Cette hormone étant pratiquement insoluble dans l'eau, nous l'avons mise en suspension dans de l'eau de mer stérile et c'est sous cette forme qu'elle a été introduite dans le corps des Crabs à l'aide d'une seringue ordinaire. Cette opération ne présente aucune difficulté : il suffit d'utiliser une aiguille de lumière suffisante et de bien agiter le contenu de la seringue juste avant la piqure.

La suspension préparée renfermait 1.000 U. I. d'activité androgène ; elle a été administrée aux animaux en trois injections de 25 U. I., espacées de cinq et dix jours.

2. Résultats.

Sur les huit femelles injectées, une seule est morte treize jours après réception de la première dose. Tous les témoins ont survécu.

Au bout de trois semaines, à la dissection, aucune anomalie dans l'état des ovaires et des gonoductes, comparés à ceux des témoins, n'a pu être relevée.

Remarquons que, puisque ces essais montrent que les Crabes supportent bien la déhydro-isoandrostérone, il pourrait être intéressant de les renouveler en débutant sur des Crabes impubères, de les poursuivre pendant plusieurs cycles d'intermue et de surveiller le développement des caractères sexuels externes pour y déceler une éventuelle masculinisation.

E. — Hormones oestrogènes.

1. Technique.

Le benzoate d'oestradiol pur dont nous nous sommes servi a été injecté à raison de 0,25 ml de suspension, l'injection étant renouvelée trois fois. La suspension employée titrait 100.000 U. I. d'activité oestrogène par ml et chacun des huit Crabes ♂ de 25 mm traités a donc reçu un total de 75.000 U. I.

2. Résultats.

Tous les animaux ont parfaitement vécu durant les trois semaines de l'expérimentation. Leur dissection n'a révélé aucune altération ou régression des testicules et des voies génitales, ces organes paraissant fonctionnels et sans différence aucune avec ceux des témoins.

Cette hormone oestrogène est donc bien supportée par les Crabes et ne paraît pas agir sur leur appareil génital.

F. — Conclusions.

Des expériences d'injections d'hormones pures de Vertébrés au Crabe *Carcinus maenas* montrent que ces animaux supportent sans gêne sensible des doses parfois considérables de ces produits. Non seulement ils résistent à l'introduction dans leur milieu intérieur de protéines étrangères (hormones gonadotrope, somatotrope et corticotrope) sans déclencher de réaction immunologique fatale, mais ils subissent encore sans dommage apparent la présence, dans leur système circulatoire, de cristaux d'activités androgène ou oestrogène.

Ces constatations autoriseraient à leur faire subir un traitement de plus longue durée de manière à confirmer ou à contredire l'absence d'action de ces substances que les essais décrits paraissent indiquer.

En effet, aucune des injections réalisées n'a provoqué de réaction macroscopiquement perceptible de la part des organes dont on aurait pu attendre une réactivité.

Ainsi, sous réserve de vérifications ultérieures, nous inclinons à penser que les hormones de Vertébrés ne rencontrent chez *Carcinus maenas*, et sans doute chez les Crustacés en général, qu'un terrain où leur activité reste sans résonance.

III. — INJECTIONS D'EXTRAITS DE SACCULINE

A. — **But.**

L'une des hypothèses qui viennent naturellement à l'esprit quand on cherche à expliquer l'action féminisante de la Sacculine sur les Crabes ♂, est celle qui consiste à supposer que le parasite émet dans l'hémolymph de son hôte, par diffusion au travers des parois de ses racines, une ou plusieurs substances ayant, par voie directe ou indirecte, un potentiel féminisant.

Il a déjà été signalé que c'est sans doute cette idée qui a suscité les travaux de R. LÉVY (1923), lesquels tendent à mettre en évidence de telles substances chez la Sacculine. Plus récemment, elle a été reprise en partie par E. G. REINHARD et Th. von BRAND (1944) qui n'excluent pas que les troubles métaboliques observés chez les Crustacés parasités par des Rhizocéphales soient dus à l'émission par ceux-ci de substances plus ou moins toxiques, véhiculées par l'hémolymph de ses hôtes. Ces auteurs s'étonnent même que d'autres recherches n'aient pas été faites dans cette voie.

Pensant d'une part que, si réellement la Sacculine synthétisait de tels produits hormonaux ou toxiques, ceux-ci devraient pouvoir se retrouver dans les extraits de ces animaux ; raisonnant, d'autre part, un peu par analogie avec les Vertébrés en supposant que, si des hormones sexuelles existent chez les Crabes, elles ont quelque chance d'être chimiquement voisines des stéroïdes et des lipides ; admettant enfin que la toxicité des extraits préparés par R. LÉVY pouvait être due à des protéines nocives ou dégradées, nous avons recherché la réaction des Crabes à des injections d'extraits lipidiques de sacs viscéraux de Sacculine.

Ces essais ont été complétés par des injections de sérum de Crabes sacculinés et en nourrissant d'autres sujets uniquement avec des sacs viscéraux.

B. — **Préparation de l'extrait.**

Soixante et un sacs viscéraux de Sacculines bien vivantes et d'une largeur moyenne de 15 mm ont été homogénéisés dans un appareil Turmix avec 100 ml d'eau de mer stérile. La suspension obtenue a été centrifugée pendant cinq minutes à 6.000 tours/minute. Il en est résulté, dans les tubes à centrifugation, un gâteau superficiel consistant, une phase liquide et laiteuse intermédiaire et, au fond, un culot solide. Le gâteau superficiel a été recueilli par découpage et dissout dans 10 ml d'éther sulfurique où il est parfaitement soluble. La solution obtenue a été lavée trois fois dans une ampoule à décanter avec 10 ml d'eau physiologique. Par évaporation, l'épiphase jaune a laissé un extrait cireux jaune orange E₁.

La phase liquide intermédiaire a été chauffée à 100° C au bain-marie à l'ébullition. Il en est résulté une prise en masse due à la précipitation des protéines. La centrifugation de ce coagulum a fourni un liquide L jaune clair et limpide, ainsi qu'un culot de protéines dont les extractions à l'éther donnent un faible résidu E₂ de teinte jaunâtre.

Finalement, le culot de centrifugation du broyat total des sacs viscéraux a été remis en suspension et centrifugé trois fois dans 10 ml d'alcool absolu. La solution alcoolique jaune pâle qui en est résultée a laissé, après évaporation sous pression réduite, un extrait sec E₃.

L'ensemble des extraits E₁, E₂ et E₃ a été émulsionné par agitation prolongée dans le liquide L et c'est cette émulsion qui a été injectée aux Crabes.

C. — Les injections.

Elles ont été faites à l'aide de micropipettes en verre, très fines et jaugées au mercure de 0,2 à 0,3 ml. Les animaux ont été piqués à l'articulation basale des pattes locomotrices, endroit qui semble le plus propice à de telles opérations.

Pour de tels essais et bien que les injections en aient été rendues plus délicates, il convenait de choisir des Crabes ♂ jeunes, impubères et à cycle d'intermue assez court. Nous avons donc travaillé sur un lot de trente-deux individus de 9 à 13 mm de long. Ceux d'entre eux qui ne mesuraient que 9 ou 10 mm ont reçu des doses de 0,2 ml d'émulsion ; aux autres, nous avons injecté 0,3 ml.

D. — Résultats.

Vingt-trois Crabes sont morts dans un délai de un à cinq jours après l'injection. D'après la réaction des témoins injectés à l'eau de mer stérile dont deux seulement ont péri, il est peu probable que ces morts soient dues à un traumatisme.

Parmi les neuf survivants, cinq ont mué normalement au bout d'un délai suffisant pour que d'éventuelles hormones aient eu le temps d'exercer leur action. Sur aucun de ces animaux n'a été constaté une quelconque modification des caractères sexuels externes.

IV. — INJECTIONS DE SERUM DE CRABES SACCULINES

Si la Sacculine excrète une substance active dans l'organisme de son hôte, cette substance sera véhiculée par l'hémolymph.

Pour essayer de mettre en évidence une telle activité, nous avons injecté à quatorze Crabes ♂ de 12 à 14 mm, des doses de 0,2 à 0,3 ml de sérum prélevé sur des donneurs de grande taille, porteurs de grosses Sacculines externes et fortement féminisés. Six d'entre eux ont péri dans les cinq jours, mais parmi les huit autres, six ont mué normalement dans des délais variables. Aucun des animaux ayant fait son exuviation n'a manifesté de transformation des caractères sexuels externes.

V. — ALIMENTATION DE CRABES AVEC DES SACCULINES

En thérapeutique humaine, certaines hormones peuvent être absorbées par voie digestive. Il suffit pour cela que leur structure ne soit pas altérée lors du passage au travers de la paroi intestinale.

Nous avons admis qu'il pouvait en être de même chez les Crustacés et c'est pourquoi, pendant un mois, seize Crabes ♂ de 9 à 12 mm ont été nourris exclusivement

avec des sacs viscéraux frais de Sacculine. Il est curieux de constater à quel point les animaux sont friands d'une telle nourriture sur laquelle ils se précipitent pour la déchiqueter. Ce régime semble d'ailleurs leur convenir car, au terme d'un mois d'élevage, trois d'entre eux seulement sont morts, dont deux à la suite de mues anormales. Parmi les treize survivants, cinq ont mué sans difficulté, mais ici encore aucun signe de féminisation n'a pu être enregistré.

VI. — Conclusions.

Ces essais, bien qu'incomplets par suite de la durée restreinte pendant laquelle ils ont pu être poursuivis en Station biologique, ont néanmoins montré que, ni les extraits lipidiques de sacs viscéraux, ni le sérum de Crabes sacculinés, ni une alimentation à base exclusive de sacs viscéraux, n'exercent une influence féminisante sur les Crabes ♂, du moins à la première mue qui suit l'un ou l'autre de ces traitements. En serait-il de même si cette expérimentation était poursuivie pendant plusieurs cycles d'intermue ? Seules de nouvelles recherches pourront donner une réponse définitive.

En ce qui concerne la toxicité des extraits de Sacculines, il semble qu'effectivement ces liquides, même déprotéinés, aient une action nocive sur les Crabes et, dans ce domaine, nos conclusions rejoignent celles de R. LÉVY.

CHAPITRE IV

ETUDE DES ACIDES-AMINES DE L'HEMOLYMPHE DE *CARCINUS MAENAS* PAR CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

I. — GENERALITES

Parmi les Arthropodes, c'est surtout dans la classe des Insectes qu'ont été étudiés les acides-aminés. Leur forte concentration dans le plasma sanguin de ces animaux est même devenu un caractère biochimique systématique.

Mais il existe aussi une série de travaux dont le but a été d'inventorier les acides-aminés libres de divers groupes d'Invertébrés. Parmi les plus récents, citons ceux de M. N. CAMIEN et Coll. (1951), G. DUCHATEAU et M. FLORKIN (1954), M. F. GIORDANO et Coll. (1950). Les méthodes microbiologiques employées par ces auteurs sont permises, notamment à M. N. CAMIEN et à ses collaborateurs, de déceler la présence de fortes concentrations de glycine dans les muscles de *Homarus vulgaris* et de *Maia squinado*. Les constituants non protéiques du Homard ont été étudiés par W. O. KERMACK, H. LEES et J. D. WOOD (1955) ; ils se sont révélés formés par une fraction importante d'azote α -aminé. Dernières en date sont les recherches de J. W. SIMPSON, K. ALLEN et J. AWAPARA (1959) qui explorent par chromatographie sur papier et sur colonne la composition en acides aminés libres de très nombreux animaux aquatiques, dont certains Crustacés.

En ce qui concerne l'existence de ces molécules organiques fondamentales chez *Carcinus maenas* en particulier, on trouvera certaines données dans les travaux de H. DELAUNAY (1934), M. FLORKIN et G. FRAPPEZ (1940), A. DRILHON et R. G. BUSNEL (1950).

Ces deux derniers auteurs ont utilisé la chromatographie sur papier pour faire l'inventaire des acides-aminés libres de l'hypoderme dorsal et ventral de Crustacés de types pigmentaires différents. Chez les Crustacés à mélanine, dont fait partie *Carcinus maenas*, ils ont identifié les acides-aminés suivants, classés par ordre de concentration décroissante : glycocolle, alanine, valine, tyrosine, acide glutamique, acide aspartique, leucine, histidine, proline.

De notre côté, l'importance des acides-aminés dans la synthèse et la dégradation des polypeptides et protéines dont ils sont les chaînons, la part qu'ils peuvent donc avoir dans l'anabolisme et le catabolisme d'éventuelles hormones de nature protéique, nous ont incité à rechercher ces substances dans le liquide cavitair de l'animal qui nous occupe, afin de pouvoir comparer sous cet angle les individus normaux et sacculinés.

Du point de vue méthodologique, la chromatographie sur papier s'imposait par la possibilité qu'elle offre de travailler sur de très faibles quantités de sérum, donc de traiter les animaux individuellement, sans recourir à des pools d'hémolymphe.

Nous envisagerons successivement les modalités techniques choisies et les résultats obtenus.

II. — TECHNIQUES DE CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

La méthode utilisée est celle de P. BOULANGER et G. BISERTE (1949) pour le sérum humain.

A. — Principe.

Il consiste à dissoudre les acides-aminés libres du liquide à étudier dans l'acétone chlorhydrique qui a l'avantage de précipiter les protéines sans dissoudre les sels minéraux, ces derniers étant toujours gênants pour la migration sur le papier. L'extrait obtenu est ensuite délipidé à l'éther et le résidu sec des acides-aminés repris par un peu d'eau chlorhydrique. Il peut alors être chromatographié en une ou deux dimensions.

Dans la pratique, nous avons procédé comme suit :

B. — Prélèvement.

Deux ml d'hémolymphe sont aspirés à la seringue chez des Crabes de grande taille, puis centrifugés pendant dix minutes à 6.000 tours/minute en tube conique.

C. — Dessiccation.

Le sérum ainsi obtenu est desséché sous vide, en présence de chlorure de calcium, à température ambiante, dans un récipient à fond plat. Le résidu sec a une teinte noir verdâtre et peut se conserver à la glacière.

D. — Extraction des acides-aminés.

Le résidu sec est finement pulvérisé dans son récipient avec un agitateur en verre. Il est additionné de 10 ml d'acétone chlorhydrique (1 ml HCl 10 N + 100 ml acétone RP) ; le mélange est agité pendant plusieurs minutes. On recouvre ensuite d'un couvercle étanche et on laisse séjourner pendant deux heures à la température du laboratoire,

puis on transvase quantitativement dans un tube à centrifuger. Après une centrifugation de dix minutes à 6.000 tours/minute, le surnageant est recueilli par fractions de 6 ml dans un tube cylindrique à fond plat de 15×60 mm. Il est ensuite évaporé à l'étuve à 37° C. Le culot de centrifugation est encore remis deux fois en suspension et extrait dans des conditions identiques. Les fractions acétoniques sont ajoutées à la première et évaporées à leur tour.

E. — Délipidation.

Les résidus secs des extraits acétoniques sont redissous dans 0,5 ml d'eau distillée. On procède ensuite à trois extractions consécutives à l'éther sulfurique, dans le tube même. L'éther est chaque fois éliminé, d'abord par décantation, puis par aspiration avec des bandelettes de papier filtre. L'hypophase aqueuse est finalement évaporée sous pression réduite, à température ambiante, pendant vingt-quatre heures. Le résidu sec qui subsiste renferme les acides-aminés dégraissés du sérum de Crabe, accompagnés d'un minimum de sels. Il peut être repris par une quantité minime d'eau distillée légèrement acide, pour la chromatographie.

F. — Chromatographie en une dimension.

Elle a surtout été pratiquée pour des essais préliminaires de concentration devant servir à déterminer la quantité d'extrait à déposer sur le papier.

Le résidu sec provenant de 2 ml de sérum a été repris par 200 microlitres d'eau chlorhydrique, ce qui permet, en tenant compte des pertes inhérentes à l'emploi de la pipette, de faire deux dépôts de 60 microlitres, un de 40 microlitres et un de 20 microlitres. Pour limiter l'extension des taches par capillarité, les dépôts sont faits en plusieurs fois et un radiateur soufflant, placé sous le papier filtre, évapore l'eau rapidement.

Les chromatographies ont été réalisées en marche descendante, en phase phénol et atmosphère ammoniacale, avec adjonction d'une pincée de cyanure de potassium. Après un développement de quarante-huit heures, le papier est séché dans le foehn d'un radiateur soufflant, puis révélé par pulvérisation d'une solution de ninhydrine à 0.15 % dans le butanol. Un second séchage à chaud fait apparaître les acides-aminés sous forme de taches généralement violacées.

Ces essais ont montré que, dans les conditions d'expérience choisies, le dépôt de 60 microlitres donne les meilleurs résultats. Les spots obtenus sont néanmoins un peu faibles et dans toutes les chromatographies ultérieures, nous sommes parti de 2 ml d'hémolymphes dont le résidu sec des acides-aminés a été repris par 100 microlitres d'eau, avec dépôt de 40 microlitres pour les chromatographies unidimensionnelles et 80 microlitres pour les chromatographies en deux dimensions.

G. — Chromatographie en deux dimensions.

La première migration est réalisée en phénol saturé d'eau (4/1), en atmosphère humide saturée de phénol et toujours en présence d'ammoniaque (14 ml NH_4OH RP pour 100 ml d'eau saturée de phénol) et de cyanure, pendant vingt heures, à 20° C.

Après séchage, un second déplacement est obtenu par le butanol acétique préparé par agitation de quatre volumes de butanol avec un volume d'acide acétique pur et cinq volumes d'eau. La phase butanol sert de solvant et la phase aqueuse est destinée à la saturation de la cuve. La durée de la séparation est de quarante-huit heures.

Ici encore, la révélation des acides-aminés est faite à la ninhydrine et leur identification par comparaison avec des chromatogrammes de mélanges connus d'acides-aminés purs.

III. — RESULTATS

A. — Acides-aminés libres du sérum.

Plusieurs chromatographies bidimensionnelles ont été faites à partir de sérums de Crabes ♂ et ♀ indemnes ou sacculinés.

Les cartes d'acides-aminés obtenues sont sensiblement les mêmes pour ces différents groupes. Les quelques dissemblances minimes qui ont pu être observées n'ont pas paru significatives.

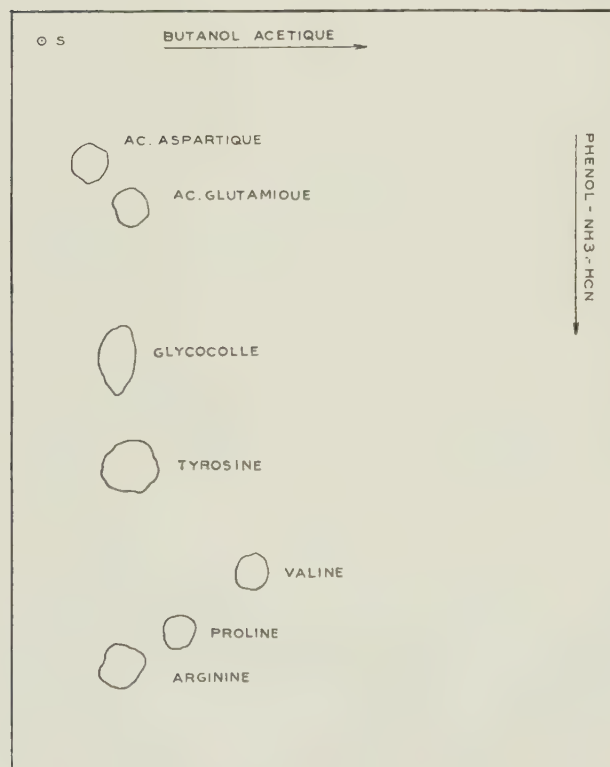


FIG. 11. — Chromatogramme bidimensionnel des acides-aminés libres de l'hémolymphe d'un Crabe ♂.

La figure 11 ci-contre représente le chromatogramme type d'un Crabe ♂ de 45 mm, au stade C₄ de son intermue et non parasité. On y distingue les taches correspondant à 7 acides-aminés connus. Ce sont : l'acide aspartique, l'acide glutamique, le glycocolle, la tyrosine, la valine, la proline et l'arginine. Ces résultats ressemblent à ceux de A. DRILHON et R. G. BUSNEL pour l'hypoderme, mais ces auteurs ont identifié l'alanine, l'histidine, la leucine en plus et l'arginine en moins. Nous ignorons jusqu'à présent si ces différences sont dues à des modalités techniques ou si elles correspondent à des spécificités d'organes.

On ne manquera pas de remarquer aussi que les acides-aminés libres sont moins nombreux dans le milieu intérieur du Crabe que dans le sang humain où P. BOULANGER en dénombre au moins treize.

Les mâles sacculinés fournissent des chromatogrammes semblables à ceux de leurs homologues indemnes. Il en est de même pour les femelles sacculinées chez lesquelles on ne relève aucun indice permettant de les distinguer des catégories précédentes.

En définitive, il ne semble donc pas que le parasitisme du Crabe par la Sacculine altère qualitativement la composition en acides-aminés libres de l'hémolymphe de l'hôte. Existe-t-il une telle perturbation du point de vue quantitatif ? Nous n'avons encore entrepris aucune recherche à ce sujet.

B. — Acides-aminés des hydrolysats de sérum.

L'hydrolyse chlorhydrique du sérum de Crabe provoque la dissociation des polypeptides et protéines de celui-ci en leurs acides-aminés élémentaires qui s'ajoutent alors aux acides-aminés préexistants.

Nous avons recherché si, par une telle intervention, il était possible de découvrir une différence suivant le sexe et la présence ou l'absence de la Sacculine.

Les hydrolyses ont été effectuées chaque fois sur un ml de sérum par ébullition sous reflux pendant vingt heures dans un appareil pour microkumagava, en présence de 20 ml d'HCl 6 N. Les hydrolysats séchés sous vide à température ambiante ont fourni des résidus secs sur lesquels les extractions ont été faites conformément à la technique décrite pour les acides-aminés libres.

Des chromatographies bidimensionnelles en phénol-butanol acétique ont mis en évidence les acides-aminés suivants : acide aspartique, acide glutamique, sérine, glycocolle, thréonine, alanine, tyrosine, histidine, lysine, arginine, proline, valine, leucine et isoleucine. Les chromatogrammes comportaient en outre deux taches que nous n'avons pu identifier. L'une est voisine de la tyrosine et l'autre proche de l'arginine. La figure 12 ci-contre reproduit un tel chromatogramme obtenu à partir d'un mâle indemne de 43 mm.

On constate que la gamme des acides-aminés ainsi décelés est beaucoup plus complète que celle des acides-aminés libres. Mais ici encore, aucune différence qualitative indiscutable n'a pu être notée entre mâles et femelles, entre animaux indemnes et sacculinés.

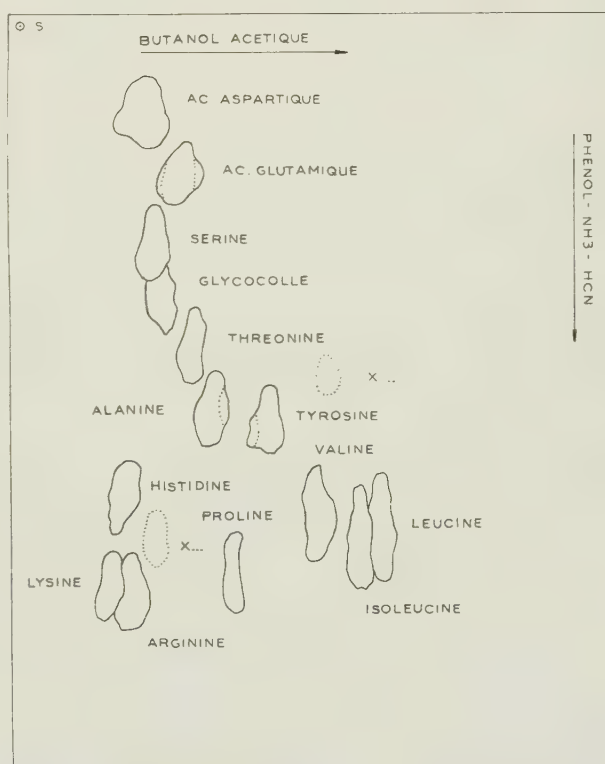


FIG. 12. — Chromatogramme bidimensionnel des acides-aminés d'un hydrolysats de sérum de Crabe ♂.

IV. — CONCLUSION

L'étude qui vient d'être développée a permis de mettre au point les modalités techniques de l'analyse par chromatographie sur papier des acides-aminés de l'hémolymph de *Carcinus maenas*.

Elle a dressé un inventaire provisoire de ces substances existant à l'état libre dans le sérum de ces animaux, ainsi que de celles qui peuvent être libérées par l'hydrolyse des protéines et polypeptides propres à ce milieu. Dans les limites de ce cadre, aucune différence qualitative n'a pu être enregistrée, ni entre les sexes, ni entre les Crabes normaux et sacculinés. Il ne semble donc pas que l'action du parasite Rhizocéphale se répercute sur le métabolisme de ces substances et il est probable que ce n'est pas par leur intermédiaire que s'exerce son influence féminisante.

Des recherches du même genre pourraient et mériteraient d'être étendues aux différents organes du Crabe, en particulier à son système glandulaire.

CHAPITRE V

ETUDE DES PROTEINES DU SERUM DE *CARCINUS MAENAS* PAR ELECTROPHORESE

I. — GENERALITES

A. — Introduction.

Sans vouloir établir une hiérarchie toujours discutable entre les substances constituant de la matière vivante, on peut néanmoins dire que les protéines y jouent un rôle fondamental.

Certaines d'entre elles représentent des matériaux de construction et servent plus ou moins passivement à l'édification des unités de base que sont les cellules. Faire leur inventaire à ce niveau ou dans les voies qu'elles empruntent pour arriver à destination est déjà du plus grand intérêt.

Mais parmi elles, il en est aussi qui interviennent plus directement encore dans les phénomènes vitaux pour leur imprimer un sceau distinctif. Ce sont les enzymes et les hormones. La connaissance de leur nature, de leurs particularités structurales, de leur mode d'action, est indispensable à la compréhension de nombreux processus physiologiques.

Le fait que, chez l'Homme et les Vertébrés supérieurs, les hormones gonadotropes et somatotrope soient de nature ou aient au moins un support protéique, nous a amené à accorder une attention toute particulière à ce groupe de substances dans l'hémolymph de *Carcinus maenas*. Notre tâche a été beaucoup facilitée par l'essor considérable qu'ont pris ces dernières années les méthodes d'investigation de ce domaine, notamment celles qui font l'objet de ce chapitre et dans lesquelles nous nous sommes spécialisé : les méthodes électrophorétiques.

Si, au risque d'être long, nous serons amenés à nous attarder sur les détails techniques, c'est que nous estimons que ces méthodes si élégantes et efficaces ne sont pas assez connues des Naturalistes, alors que leur application aisée pourrait donner des résultats remarquables dans la plupart des groupes du Règne animal.

Dans cet esprit, nous croyons utile de rappeler d'abord le principe de l'électrophorèse.

Nous passerons ensuite en revue les rares travaux qui ont étudié l'hémolymph des Crustacés par cette méthode et nous pourrons alors décrire les multiples applications que nous en avons fait pour la première fois au milieu intérieur du Crabe indemne ou sacculiné.

B. — Principe de l'électrophorèse.

L'électrophorèse est le déplacement de particules chargées électriquement, en solution ou en suspension dans un liquide, sous l'action d'un champ électrique.

Le phénomène concerne en particulier les molécules protéiques dont on sait qu'elles sont des édifices complexes d'acides-aminés unis entre eux par des liaisons peptidiques. Certains des groupements fonctionnels restés libres (NH_2 , COOH ... etc...) subissent en solution une dissociation électrolytique progressive qui dépend du pH du milieu. Lorsque celui-ci est acide, la dissociation des groupes acides diminue et la charge de la molécule devient positive par suite d'une prédominance d'ions basiques. En solution basique, c'est l'inverse qui se produit. De plus, pour un pH déterminé et caractéristique de chaque protéine appelé point isoélectrique, les charges positives et négatives s'équilibrent et la molécule devient électriquement neutre.

Lorsque donc une particule protéique en solution dans un milieu de pH autre que son point isoélectrique est soumise à l'action d'un champ électrique, elle se dirige vers la cathode si sa charge est positive, vers l'anode si elle est négative. Ce déplacement est fonction, entre autres, de la charge de la molécule et il permet de séparer un mélange de protéines de charges différentes en le mettant en solution dans un milieu tamponné soumis à un champ électrique.

Les conditions idéales de ce déplacement sont réalisées lorsqu'il peut se faire en phase liquide. Elles sont obtenues dans la technique originale de A. TISELIUS (1937) qui utilise une cellule de verre en U, à faces plan-parallèles, au fond de laquelle est déposé le mélange à analyser. Celui-ci est recouvert, dans chaque branche, d'une solution-tampon dans laquelle plongent les électrodes. La réalisation pratique de ce dispositif se heurte toutefois à des difficultés considérables et demande un appareillage volumineux et onéreux. Pour y remédier, des efforts ont été faits dans deux directions différentes. D'une part, on a cherché à diminuer la taille des cellules de TISELIUS tout en simplifiant le dispositif optique. Il en est résulté des appareils à microélectrophorèse en veine liquide, dont l'appareil Kern dans lequel nous avons fait quelques essais que nous ne citons que pour mémoire. D'autre part, on s'est efforcé d'immobiliser partiellement l'électrolyte au sein de supports solides tels que le papier, la gélose, le gel d'amidon. Ces variantes sont très favorables à l'étude de liquides ou d'organes provenant de petits animaux, car elles ne nécessitent que des quantités minimales de matière, de l'ordre du microlitre quelquefois,

ce qui permet de faire plusieurs analyses consécutives sur un même individu sans trop le perturber, donc de le suivre pendant un certain temps dans son évolution physiologique.

Si, pour étudier les protéines de l'hémolymphe de *Carcinus maenas*, nous n'avons fait que quelques essais à titre comparatif par microélectrophorèse libre, technique qui, malgré ses simplifications, se prête assez peu aux analyses en grandes séries, nous avons, par contre, exploité à fond les ressources des méthodes sur papier, en gélose et en gel d'amidon.

Avant de décrire en détail ces différentes techniques et d'en examiner les résultats, dressons un rapide bilan des travaux antérieurs.

C. — Travaux antérieurs.

Avant de passer en revue les quelques travaux qui ont utilisé l'électrophorèse comme moyen d'investigation des protéines de Crustacés, rappelons en bref ceux — tout aussi peu nombreux — qui se sont intéressés à la protéinémie générale de ces animaux.

Sans nous attarder à évoquer quelques observations très anciennes qui n'ont qu'un intérêt historique et pour lesquelles on trouvera une bibliographie détaillée chez A. DRILHON (1935), mentionnons en premier deux travaux, d'ailleurs similaires de A. DAMBOVICEANU (1929, 1932) concernant les constantes physico-chimiques du liquide cavitair des Crustacés Décapodes. Nous n'en retiendrons que les données en rapport avec nos propres recherches et concernant plus spécialement *Carcinus maenas*.

Ces travaux représentent une première tentative de fractionnement des divers composants protéiques du milieu intérieur du Crabe. Par des procédés physico-chimiques variés (échauffement, dialyse prolongée, relargage par des sels minéraux) les protéines totales, qualifiées « d'albumines totales coagulables par la chaleur » sont séparées en hémocyanines, globulines, pseudo-globulines et fibrinogène. Ce fractionnement s'accompagne d'analyses pondérales pour chaque catégorie de protéines et d'une comparaison des valeurs obtenues dans différents états physiologiques ou pathologiques des sujets. En particulier, l'auteur étudie l'importance des diverses fractions à l'approche de la mue et dans le cas des Crabes sacculinés. Ses chiffres renferment d'intéressants renseignements qu'il a omis de souligner. Pour les faire ressortir, nous avons calculé pour chaque groupe de protéines, le coefficient d'augmentation relatif à tel ou tel état. Par exemple, en ce qui concerne la mue, nous avons calculé ces coefficients en établissant le rapport :

Protéines chez l'animal proche de la mue.

Protéines chez l'animal éloigné de la mue.

Dans le cas cité, ces rapports sont, chez les individus normaux .

— Albumines totales coagulables par la chaleur	2,40
— Hémocyanine	3,01
— Globulines	4,22
— Pseudo-globulines	6,87
— Fibrinogène	1,40

Ces coefficients montrent bien l'hétérogénéité des différentes protéines de l'hémolymph et leur sensibilité inégale au bouleversement physiologique que représente la mue. Il devient évident que celle-ci n'agit pas seulement par un mécanisme de déshydratation avec augmentation uniforme de la concentration de toutes les protéines, mais aussi par une stimulation sélective de la synthèse de certaines d'entre elles, en l'occurrence des globulines et des pseudo-globulines.

Sans citer tous les coefficients qui ont été calculés — il est aisé de les retrouver d'après les données originales — nous nous contenterons de signaler les principales conclusions qui en découlent :

1° La teneur en protéines de toutes catégories augmente chez les Crabes normaux à l'approche de la mue. Cette augmentation affecte tout particulièrement les globulines et pseudo-globulines qui paraissent donc jouer un rôle important dans ce phénomène.

2° Les Crabes sacculinés éloignés de la mue ont, pour toutes les catégories de protéines, un taux supérieur à celui de leurs homologues indemnes. Cette augmentation est plus marquée pour les globulines et pseudo-globulines ; elle correspondrait à une stimulation préférentielle de la synthèse de ces substances ou à leur accumulation. Nous verrons par la suite que nos propres résultats ne confirment pas ces observations.

3° Les Crabes parasités voisins de la mue ont, pour toutes les fractions, un taux supérieur à celui de leurs homologues normaux. Cette différence pourrait être interprétée comme la résultante d'une stimulation de synthèse par la Sacculine d'une part, et de la préparation à la mue d'autre part.

4° L'augmentation des globulines, des pseudo-globulines chez les Crabes sacculinés voisins de la mue par rapport à ceux qui en sont éloignés est relativement moins importante que celle qui sépare les deux catégories homologues de Crabes normaux.

5° Les Crabes ayant perdu leur parasite et éloignés de la mue voient toutes leurs fractions protéiques augmentées par rapport aux animaux homologues des deux groupes précédents, exception faite de l'hémocyanine qui a considérablement diminué. Aucune interprétation de ce dernier fait ne peut être donnée. L'accroissement des autres fractions peut s'expliquer par une excitation de synthèse provoquée par la Sacculine, synthèse qui ne trouve plus de débouché dans la croissance et le métabolisme du parasite qui a disparu.

6° Les Crabes ayant perdu leur Sacculine et voisins de la mue sont plus riches en toutes catégories de protéines que les homologues des deux autres groupes, sauf en ce qui concerne l'hémocyanine et le fibrinogène.

Ces quelques conclusions qu'inspirent les résultats expérimentaux de A. DAMBOVICANUS suffisent à montrer que, malgré certaines imprécisions et un manque d'interprétation, les recherches de cet auteur représentent une première, mais appréciable contribution à la connaissance des protéines de l'hémolymph de *Carcinus maenas*.

En 1935, A. DRILHON fait une étude analogue de l'hémolymph de *Maia squinado* Risso. Il faut en retenir l'observation d'une chute considérable du taux protéique de ce Crustacé au moment de la mue, ainsi que sa reconstitution dans des délais si courts qu'ils paraissent invraisemblables.

Quelques années plus tard, G. TEISSIER (1938), G. TEISSIER et A. VEILLET (1939), P. DRACH et G. TEISSIER (1939) évaluent la protéinémie de *Maia squinado* par réfractométrie et attirent l'attention à la fois sur les fortes variations individuelles et la chute considérable du taux des protéines au moment de la mue et dans les semaines qui suivent. Sur ce dernier point, ils sont en contradiction formelle avec A. DRILHON car, d'après eux, la reconstitution du stock protéique ne se fait qu'au bout de plusieurs semaines.

Citons encore les recherches de P. DRACH et M. LAFON (1942), L. RENAUD (1949), C. A. LEONE (1953) qui concernent également les variations cycliques du métabolisme de l'azote et des protéines durant le cycle d'intermue.

En 1952, H. J. A. KOCH étudie l'action de l'ablation des pédoncles oculaires sur les protéines du Crabe chinois. K. A. NEILAND et B. T. SCHEER (1953) s'attachent à l'étude du même phénomène chez des animaux en inanition et trouvent des différences entre mâles et femelles.

En 1955, A. E. NEEDHAM recherche l'action des traumatismes sur l'excrétion de l'azote chez *Carcinus maenas*.

La même année, D. F. TRAVIS dose les protéines de *Panulirus argus* Latreille par microkjeldahl et constate que, chez cette espèce, elles augmentent avant la mue, diminuent fortement après, pour redevenir subnormales dès le troisième jour post-ecdysial. D'après cet auteur, l'accroissement constaté avant la mue n'est pas dû à une simple déshydratation, mais correspond bien à une augmentation réelle par suite de la résorption du matériel organique de la carapace, ce qui permet la synthèse de nouvelles protéines, même en l'absence de toute alimentation. Ces protéines contribueraient à la formation des couches pré- et post-exuviales de l'exosquelette.

Enfin, citons pour mémoire un travail très récent de B. T. SCHEER (1959) dont les bases expérimentales paraissent fort discutables.

Après ce rappel des recherches générales concernant la protéinémie, examinons maintenant celles qui se sont plus spécialement consacrées à l'électrophorèse.

Bien que la technique de TISELIUS date de 1937, elle n'a été appliquée aux Crustacés qu'à des dates beaucoup plus récentes.

Aucun travail n'a encore été consacré à l'étude électrophorétique de l'hémolymph de *Carcinus maenas*, mais il en existe plusieurs relatifs au milieu intérieur d'autres Décapodes.

En 1945, A. TYLER et C. B. METZ étudient, par cette méthode, les hétéro-agglutinines du sérum de *Panulirus interruptus* Randall. Ils constatent que le sérum de cette Langouste américaine a un pouvoir agglutinant sur les spermatozoïdes et les globules sanguins de la plupart des Invertébrés et des Vertébrés et que cette propriété est supportée par au moins 10 hétéro-agglutinines spécifiques. Celles-ci sont thermolabiles, non dialysables, inactivées par les ultra-violets et très probablement de nature protéique. Pour en préciser les caractéristiques, les auteurs soumettent le sérum de *Panulirus* à des électrophorèses en appareil de TISELIUS, après dialyse à froid pendant quarante-huit heures, contre un tampon au véronal. Les électrophorégrammes ainsi obtenus mettent en évidence un clocher principal dû à l'hémocyanine, suivi d'un clocher secondaire (α) beaucoup plus faible et de deux autres fractions minimales qui ne sont visibles qu'après 82 minutes de passage du courant. De plus, il existe une fraction stationnaire (δ ou ϵ suivant la

branche de la cellule qui représente sans doute des protéines ou d'autres substances dont le point isoélectrique correspond au pH du tampon choisi. Finalement, dans la branche descendante, on note la présence d'une fraction supplémentaire pour laquelle les auteurs ne voient aucune explication.

De ces faits, nous pouvons retenir que, dans le sérum de Langouste, l'électrophorèse en veine liquide met en évidence une ou peut-être trois fractions protéiques différentes de l'hémocyanine ; que ces fractions mineures représentent, si l'on se base sur les surfaces comparées de leurs clochers, environ 2 à 3 % de l'hémocyanine. Après prolongation de l'électrophorèse, on a pu prélever ces composants supplémentaires dans l'appareil, sans aucune contamination par l'hémocyanine. Des essais ultérieurs ont aussi montré que ces fractions seules supportent l'activité hétéro-agglutinante, à l'exclusion de l'hémocyanine qui en est totalement dépourvue. Enfin, l'ultracentrifugation à 120.000 g a montré que ces molécules sont du même ordre de grandeur que celles de l'hémocyanine.

Dans un second travail contemporain du précédent, A. TYLER et B. T. SCHEER (1945) abordent la même question sous un angle plus restreint en faisant uniquement l'étude électrophorétique des fractions à pouvoir agglutinant, ceci après une première séparation de l'hémocyanine par dialyse contre un tampon acétate à pH 4,5. Ils ont en effet constaté qu'au début de cette dialyse, entre pH 5 et 4,8, il ne se forme qu'un léger précipité blanc ou jaune, indemne de toute hémocyanine et supportant à lui seul le pouvoir hétéro-agglutinant. C'est dans ce matériel redissous, reprécipité et redialysé contre un tampon véronal (pH 7,7) qu'une électrophorèse de 59 minutes met en évidence un composant rapide (F) et un autre plus lent (S), le dernier étant environ cinq fois plus important que le premier et seul à supporter l'activité agglutinante.

Ces expériences ne représentent qu'une partie d'un travail plus étendu orienté vers des problèmes immunologiques. En ce qui concerne notre sujet, elles établissent que :

- l'hémocyanine n'est pas le seul composant protéique du Homard et probablement des Crustacés en général, ce qui, jusqu'alors, n'était pas admis par tous les spécialistes ;
- ces protéines non hémocyaniques comportent sans doute des sous-fractions ;
- leur ensemble représente environ 2 à 3 % des protéines totales du sérum.

En 1954, F. J. JOUBERT, dans le cadre d'une étude physico-chimique de l'hémocyanine de la Langouste *Jasus lalandii*, soumet cette substance à des électrophorèses selon TISELIUS. L'hémolymph fraîche est d'abord diluée par un tampon phosphate de pH 6,5, puis dialysée contre celui-ci. L'auteur considère que le liquide cavitair ne contient que de l'hémocyanine et fait abstraction de toute autre protéine éventuelle. Le fait que tous ses essais soient réalisés systématiquement à partir d'hémolymphes bleues ou vertes, avec exclusion volontaire de toutes les autres, notamment celles qui sont d'un brun sombre parce que proches de la mue, explique aisément qu'aucun autre groupe protéique ne lui soit apparu. Pourtant, nous le verrons par la suite, ces autres composants peuvent atteindre dans certains cas une importance quantitative égale ou même supérieure à celle de l'hémocyanine.

Cette remarque faite, soulignons que les travaux de JOUBERT fournissent des précisions intéressantes sur le comportement électrophorétique de l'hémocyanine de Langouste

et montrent que ce comportement est variable suivant le mode de préparation ou de conservation de la protéine et dépend, pour une bonne part, des conditions expérimentales.

Ainsi, lorsque l'électrophorèse est faite en tampon phosphate sur une hémolymphé dialysée, l'hémocyanine se révèle hétérogène et montre un composant majeur plus rapide et un composant mineur plus lent, ce dernier représentant environ 5 % du total. Si l'hémolymphé dialysée est additionnée de sulfate d'ammonium à 50 % qui précipite l'hémocyanine, les résultats restent analogues, mais le composant lent paraît un peu plus abondant. D'autre part, si l'hémocyanine est conservée desséchée et congelée, l'électrophorèse y met en évidence deux composants à peu près équivalents en quantité et de mobilités inchangées. Par contre, si l'hémocyanine est préparée par précipitation à un pH voisin de son point isoélectrique, par exemple par dialyse contre un tampon acétate à pH 5, on ne retrouve à l'électrophorèse qu'un seul constituant dont la mobilité est celle du composant majeur des essais précédents. Finalement, la substitution au tampon phosphate d'un tampon véronal à pH 7.8 provoque, dans la branche ascendante de la cellule, la subdivision du composant majeur en quatre sous-fractions de mobilités voisines, le composant mineur restant inchangé.

Cette étude, bien qu'un peu restreinte puisqu'elle ne tient délibérément compte que de la seule hémocyanine, est néanmoins intéressante pour montrer que, dans certaines conditions, ce chromoprotéide se révèle hétérogène en électrophorèse libre. La variabilité de ses résultats suivant le tampon employé nous incite aussi à toujours tenir compte des facteurs expérimentaux avant toute interprétation.

En 1956, Y. DE HAENE, se référant à notre publication préliminaire (R. FRENTZ, 1954), utilise l'électrophorèse sur papier pour déterminer la composition protéique de l'hémolymphé du Crabe euryhyalin *Eriocheir sinensis* M. Edw. D'après ces expériences, le nombre des fractions observables n'est lié ni au sexe, ni au cycle d'intermue. Par contre, une inanition prolongée amène des changements considérables de la protéinémie. Il en est de même lorsque les animaux sont privés de leurs pédoncules oculaires ; cette opération fait apparaître des fractions protéiques supplémentaires.

En 1958, dans le cadre d'une étude très documentée et critique de l'hémocyanine et du cuivre chez *Maia squinado* Risso, E. ZUCKERKANDL fournit les résultats de l'analyse de la protéinémie du liquide cavitaire de cet animal par la technique sur papier. Cette étude a le mérite de se baser sur un nombre précis d'animaux dont la taille, le sexe et les stades d'intermue sont rigoureusement définis. Elle met en évidence cinq ou six fractions différentes dont plusieurs n'ont qu'une existence incertaine. La fraction la plus distale par rapport à la ligne de départ est sans nul doute l'hémocyanine. La réalité de celle qui lui fait suite nous paraît, à la lumière de nos propres essais, plus discutable. Le rôle et la nature de la fraction 3 qui se retrouve chez tous les individus immatures en C₄ et A sont inconnus. Les fractions 4 et 5 sont assez proches du start. Une sixième fraction dénommée K se signale par sa présence très inconstante et indépendante de tous les facteurs examinés.

Par des mesures de la mobilité électrophorétique des différentes fractions, l'auteur constate une réduction de la vitesse de migration, donc une transformation qualitative de l'hémocyanine peu de temps après la mue. A la même époque, l'ensemble des protéines sériques s'affaiblit et une disparition presque totale de l'hémocyanine est signalée entre A et C₂. Des mesures photométriques donnent enfin une image semi-quantitative de ces variations.

La brève revue de ces travaux, dont les plus récents sont ultérieurs au début de nos propres recherches, montre combien sont rares les tentatives faites pour étudier de façon approfondie les protéines de l'hémolymph des Crustacés par la technique pourtant si fine de l'électrophorèse. Aussi avons-nous pensé qu'il était indispensable et qu'il pourrait être fructueux de pousser plus avant dans cette voie, de manière à faire bénéficier les Invertébrés des avantages d'une méthode qui a été si féconde en sérologie humaine.

Après quelques essais d'électrophorèse libre qui ont suffi à nous montrer que cette méthode n'était guère appropriée aux recherches que nous envisagions, nous avons, pour la première fois, appliqué à des Crustacés la technique plus commode de l'électrophorèse sur papier. Nous nous sommes ensuite efforcé d'élargir et d'approfondir ces résultats en remplaçant le papier par le support transparent qu'est la gélose. Cette variante permet elle-même l'emploi d'une méthode encore beaucoup plus féconde : l'immuno-électrophorèse. Enfin, à cette gamme déjà très étendue se sont encore ajoutées les possibilités de l'électrophorèse en gel d'amidon.

Ce sont ces différentes techniques qui vont être décrites en donnant pour chacune le mode opératoire et les résultats obtenus.

II. — ELECTROPHORESE SUR PAPIER

A. — Introduction.

Tenant compte des difficultés de l'électrophorèse libre, H. D. CREMER et A. TISELIUS ont élaboré, en 1950, l'électrophorèse sur papier qui a été perfectionnée par la suite par E. DURRUM (1950), W. GRASSMANN et K. HANNIG (1950), M. MACHEBŒUF, P. REBEYROTTE et M. BRUNERIE (1951) ainsi que par de nombreux autres auteurs.

Son principe consiste à réaliser la séparation électrophorétique non plus en phase liquide libre, mais dans un tampon partiellement immobilisé dans une bande de papier filtre. Les fractions ainsi séparées sont ensuite mises en évidence par coloration spécifique et peuvent être évaluées de façon semi-quantitative par photométrie. Les bandes d'électrophorèse peuvent, dans certaines conditions, se garder longtemps et constituer de la sorte des archives faciles à consulter.

Cette technique est devenue d'emploi courant dans les laboratoires de biologie clinique. Elle n'avait jamais été appliquée à l'étude du sang des Crustacés lorsque, en 1954, nous fîmes les premiers essais avec le sérum de *Carcinus maenas*. Leurs résultats prometteurs nous ont incité à les reproduire de nombreuses fois pour étudier en détail divers états physiologiques et pathologiques des Crabes. La plupart d'entre eux ont été faits sur appareil Jouan (1), mais nous nous sommes également servi d'appareils Elphor (2) et Lerès (3), ce dernier étant d'un principe un peu différent. Un certain nombre d'électrophorèses ont également été réalisées dans une cuve à usages multiples que nous avons mise au point et que nous décrirons en détail dans le chapitre consacré à l'électrophorèse sur gélose.

(1) Etablissements Jouan, 113, Boulevard Saint-Germain, Paris (6°).

(2) Bender et Hobein, 71-73, Lindwurmstrasse, Munich.

(3) Laboratoires Lerès, 9, Cité Canrobert, Paris (15°).

Le nombre d'analyses réalisées nous a permis d'acquérir une certaine expérience dans la mise en œuvre de cette technique encore trop peu répandue dans les laboratoires biologiques. Le souci de sa vulgarisation et les perfectionnements apportés nous incitent à en faire la description détaillée à l'aide de l'appareil qui nous a le plus servi.

B. — Description de l'appareil.

Il comporte une alimentation en courant, une cuve à électrophorèse et un photomètre.

L'alimentation à haute tension continue et stabilisée fournit le courant qui produit le déplacement électrophorétique. Un commutateur permet de sélectionner les tensions de 120-150-300-400 volts, contrôlables par un voltmètre. Deux bornes fournissent le courant à des électrodes circulaires en fil de platine.

La cuve à électrophorèse en plexiglas moulé, de forme allongée et rectangulaire, se subdivise en trois compartiments dont les deux latéraux, plus petits, renferment la solution tampon. Ces deux derniers sont subdivisés chacun en trois, par deux cloisons mobiles qui permettent, d'une part la fixation des bandes de papier filtre par un système de pinces et de masselotes, d'autre part la régularisation du flux de courant par isolement partiel des électrodes. La cuve est fermée par un couvercle en forme de toit, percé de deux trous aux extrémités, pour le passage des électrodes.

Le photomètre, incorporé au bloc d'alimentation, comporte une lanterne de 6 volts, 45 mA, réglée statiquement, et qui envoie une raie lumineuse sur la bande de papier à étudier. Celle-ci se déplace d'un mouvement synchrone et la lumière qui la traverse impressionne une cellule photoélectrique à couche d'arrêt qui commande elle-même un micro-ampèremètre et un système d'enregistrement graphique semi-automatique.

C. — Mode opératoire.

La description que nous en donnons s'attache surtout à des remarques basées sur une expérience personnelle, remarques qui permettent d'obtenir des résultats homogènes et comparables. L'ordre chronologique des opérations est le suivant : préparation du papier, préparation de la cuve, préparation du sérum, dépôt du sérum, électrophorèse, coloration, photométrie.

1. Préparation du papier.

Nous utilisons des bandes rectangulaires de papier d'Arches n° 304, de 350×27 mm. Nous y traçons au préalable trois traits transversaux au crayon, le premier à 110 mm du bord de la bande, le second à 15 mm du précédent et le troisième à 195 mm du deuxième. Les deux traits extrêmes servent à découper la partie utile de la bande en fin d'électrophorèse et leur espacement correspond à la course utile du photomètre. Le trait intermédiaire, limité à deux tirets de 2 mm sur les bords du papier, sert de repère pour le dépôt du sérum. Pour faciliter le travail en série, il est bon d'avoir une bande modèle sur laquelle sont alignées les bandes vierges pour le tracé.

2. Préparation de la cuve.

Les compartiments latéraux sont remplis à un cm du bord avec environ 300 ml de liquide chacun. Le tampon de Durrum (véronal 1.84 g, véronal sodique 10,3 g, eau distillée q. s. p. 1.000 ml ; $\text{pH} = 8,6$), couramment employé pour l'électrophorèse du sérum humain, nous a donné de bons résultats avec l'hémolymph de Crabe. Son adoption rend possible une comparaison des vitesses de migration des protéines de ces deux provenances.

Les bandes de papier filtre sont alors fixées à l'aide des pinces sur les cloisons mobiles internes, puis tendues à l'aide des masselotes. Le tampon monte par capillarité dans le papier et l'imbibe en entier au bout d'une demi-heure. Ce système est préférable à tous les autres, car il donne les résultats les plus réguliers. Dès le début de l'imbibition, la cuve est recouverte de son couvercle et le tampon amené au même niveau dans les deux compartiments latéraux par une communication temporaire. Cette précaution est indispensable pour éviter des courants hydrauliques dans le papier. La communication est réalisée très facilement par un tube en verre en Y dont chaque branche est prolongée par un tube de caoutchouc. La branche impaire sert à l'aspiration ; les deux autres mettent en communication les deux compartiments en passant par les trous du couvercle.

Le même tampon peut servir à cinq ou six électrophorèses. Il suffit de lui ajouter chaque fois un peu d'eau distillée pour compenser l'évaporation. Il est également recommandé d'inverser les électrodes de temps à autre de manière à éviter toute polarisation unilatérale.

On pourra constater que la migration des fractions est toujours plus lente avec un tampon frais qu'avec un tampon usagé.

La durée de l'imbibition peut être mise à profit pour la préparation du sérum.

3. Préparation du sérum.

L'hémolymph à étudier est obtenue à partir de Crabes vivants venant d'être pêchés ou suivis en élevage. Pour chacun d'eux, à chaque essai, est établie une fiche d'électrophorèse mentionnant la provenance, le sexe, la taille, les pigmentations dorsales et ventrales, l'étape d'intermue. Pour les animaux sacrifiés immédiatement après le prélèvement, la dissection permet en plus de noter l'aspect de l'hépatopancréas, des gonades, la présence et le développement de parasites éventuels, de même, s'il y a lieu, la féminisation ou toute autre particularité de ce genre. La fiche comporte aussi l'indication du pH du tampon, la quantité de sérum déposée, sa couleur, le voltage, l'ampérage initial et final, le temps de passage du courant, la durée et la température des séchages ainsi que les durées de coloration et de lavage. Pour les Crabes suivis en élevage, une fiche d'élevage signale la provenance de l'animal, son sexe, sa taille ou ses tailles successives, la date de mise en élevage, les dates de mues, celles des expérimentations successives et, d'une manière générale, tous les événements physiologiques observables.

La prise de sang s'effectue sans difficulté en immobilisant le Crabe par un serrage léger dans une pince à griffes de laboratoire. A l'usage, les seringues à injection de un cc du type dit « à pénicilline » et armées d'une aiguille de 25/5 se sont révélées les meilleures, leur aspiration étant lente et progressive, bien adaptée à la taille moyenne des nos animaux. L'aiguille est introduite par la membrane articulaire basale de l'une des pattes locomotrices postérieures. Tous ceux qui ont pratiqué des prises de sang chez des

Décapodes savent combien les résultats sont inconstants. Souvent, l'hémolymph jaillit sans difficulté dans le corps de la seringue, mais de nombreuses fois aussi l'animal ne cède que difficilement son liquide cavitare. Cette variabilité est en rapport avec le cycle d'intermue d'une part, le donneur étant très généreux à toutes les étapes qui suivent de près l'exuviation et beaucoup moins par la suite ; d'autre part, avec la pénétration de l'aiguille dans un sinus important. La méthode qui nous a donné les meilleurs résultats est celle qui consiste à arrêter la pénétration de l'aiguille dès que le biseau terminal a franchi la membrane articulaire. Il ne faut donc pas pénétrer en profondeur dans le corps du Crabe ; il faut éviter aussi d'aspirer le film d'eau de mer qui recouvre l'animal et qui peut diluer l'hémolymph recueillie. Il s'avère toujours utile de laisser l'animal à sec quelque temps avant d'effectuer la prise.

Les quantités de sang prélevées ont été variables. Chez les animaux destinés à être suivis pendant un certain temps en élevage, nous nous sommes toujours contentés d'un volume minimum, de manière à ne pas perturber le métabolisme de l'animal. Etant donné qu'une électrophorèse ne nécessite que 20 microlitres de sérum, mais que, d'autre part, l'hémolymph doit être centrifugée, nous estimons que des prises de 50 à 100 microlitres sont amplement suffisantes, à condition que le prélèvement soit effectué avec soin et sans dilution. Dans le cas où l'animal est sacrifié immédiatement après la prise, on a intérêt à aspirer le plus de liquide cavitare possible de façon à diminuer les chances de dilution.

L'hémolymph prélevée est centrifugée pendant cinq minutes à 9.000 tours/minute dans des tubes coniques dont la partie inférieure est très effilée pour faciliter l'aspiration du surnageant. Le culot blanc formé au fond du tube représente les éléments figurés du liquide cavitare. Souvent aussi, il se crée à la surface un mince gâteau solide qui est probablement dû à des protéines dénaturées, car sa formation est assez abondante lorsque l'hémolymph mousse lors de son introduction dans le tube. Comme nous le verrons par la suite, cette couche superficielle peut donner lieu à des artéfacts en l'absence de certaines précautions.

Ainsi qu'il a été dit plus haut, de chaque sérum a été noté la couleur. Il s'agit là d'une observation assez subjective et il est bon, sans aller jusqu'à comparer la teinte du liquide à une échelle-test, de limiter sa variabilité. L'aspect du liquide change en effet du tout au tout suivant les conditions d'observation et d'éclairage. Aussi nous sommes-nous toujours placé dans des conditions identiques en observant le sérum sur le fond blanc du carrelage du laboratoire, en un endroit bien éclairé. La difficulté subsiste néanmoins lors des électrophorèses de nuit et il faut une certaine habitude pour apprécier avec justesse les couleurs sous l'éclairage artificiel.

4. Dépôt du sérum.

Le sérum est déposé sur le papier à l'aide d'une micropipette de 20 microlitres. Les micropipettes commerciales ont une pointe trop courte et trop épaisse pour pénétrer dans le cône effilé du tube à centrifuger. Aussi avons-nous fabriqué des micropipettes plus adaptées en étirant du tube capillaire de 4 mm de diamètre extérieur. D'une longueur de 19 cm, elles ont une partie effilée de 6 à 7 cm qui permet de puiser facilement au fond des tubes, donc s'opérer sur de faibles quantités d'hémolymph. La pointe en est rodée en biseau afin de ne pas arracher les fibres du papier filtre lors du dépôt. Le jaugeage se fait au mercure, par pesée. La manipulation de ces pipettes est beaucoup facilitée lorsqu'on les prolonge par un tube de caoutchouc de 30 cm de long qui facilite l'aspiration et l'expulsion du liquide sous contrôle visuel.

Pour les remplir, plonger une première fois la pointe dans le sérum en crevant le gâteau superficiel. Les ressortir ensuite pour les débarrasser des particules solides entraînées qui, par leur dépôt sur le papier, fausseraient la figure électrophorétique. Les replonger ensuite dans le liquide en passant par l'orifice précédemment créé, et aspirer.

Le dépôt du sérum se fait suivant le tracé repère, par insufflation légère, en déplaçant régulièrement la pipette suivant la largeur du papier, sans approcher à plus de 2 mm des deux bords. Il est prudent de toujours laisser dans la pipette un résidu infime de liquide, de manière à ne pas créer de bulles sur le papier, ces dernières risquant de provoquer des concentrations ou des dénaturations locales de protéines qui se traduisent toujours par des irrégularités dans les taches colorées. Une fois le sérum déposé sur toutes les bandes, retendre le papier par pression mesurée sur les masselotes et mettre en route l'électrophorèse.

5. *Electrophorèse.*

Elle consiste à faire passer le courant électrique par l'intermédiaire des électrodes au travers des bandes tamponnées qui portent le sérum. Après divers essais, aux tensions élevées de 300 et 400 volts qui échauffent trop le liquide et peuvent dénaturer les protéines, nous avons préféré des voltages plus faibles : 110 volts pour une électrophorèse de nuit, 150 volts pendant le jour. A 150 volts, une bonne séparation nécessite environ sept heures et, dans ces conditions, le front des protéines parcourt de 12 à 15 cm. L'intensité du courant est alors en moyenne de 2,5 mA pour trois bandes au début de l'opération et de 4 ou 5 mA à la fin. Cette variation s'explique par une augmentation progressive de l'imbibition du papier qui devient plus perméable au courant. A 110 volts, les résultats sont à peu près semblables et s'obtiennent en dix ou onze heures. L'ampérage se trouve naturellement réduit.

L'adoption de ces voltages et de ces durées d'expérience permet de réaliser facilement une électrophorèse de jour et une autre de nuit, tout en laissant des délais suffisants pour la préparation et le nettoyage du matériel.

Lorsque le sérum déposé présente une coloration suffisante, bleue, jaune ou orange, il est aisé de suivre, surtout en début d'expérience, la migration des protéines.

Pendant l'électrophorèse, en particulier durant la première partie, il est prudent de surveiller les électrodes et l'ampèremètre, car l'anode se charge assez rapidement de sels qui s'opposent au passage du courant et font baisser l'intensité. Il suffit dans ce cas de rincer l'électrode en question et de la remettre en circuit après cette interruption éphémère.

Une fois l'électrophorèse terminée et les masselotes enlevées, on découpe les bandes de papier filtre suivant les lignes prévues pour les déposer sur une plaque de verre de format approprié en vue d'un séchage rapide à l'étuve à 80° C. Dans ces conditions, les bandes sont parfaitement sèches au bout de trente à quarante minutes et prêtes pour la coloration.

6. *Colorations et lavage.*

Les protéines, séparées sur le papier filtre suivant leurs mobilités, peuvent être rendues visibles par coloration.

On peut leur appliquer une coloration générale qui mettra en évidence toutes les fractions protéiques, ou des colorations particulières qui n'affectent que certaines d'entre elles suivant leur nature chimique.

Nous avons effectivement soumis les bandes à une coloration globale des protéines, à une coloration spécifique des glycoprotéides ainsi qu'à une coloration qui caractérise les lipoprotéines.

a) *Coloration générale des protéines.*

— *Bleu de bromophénol.* — Les bandes sèches sont colorées pendant dix ou quinze minutes dans la solution colorante contenue dans un récipient plat et clos. La plupart des colorations ont été faites avec une solution de composition : bleu de bromophénol 1 g ; chlorure mercurique 325 g ; alcool à 96° 1.000 ml. Une fois colorées, les bandes sont lavées sous un fort courant d'eau orienté de manière à brasser le papier sans l'abîmer et sans provoquer de superposition des bandes. La coloration initiale jaune vire progressivement au bleu et la poursuite du lavage élimine l'excès de colorant. Au bout de vingt minutes, les fractions protéiques restent colorées en bleu, alors que le fond du papier est redevenu blanc. Chaque bande porte alors une ou plusieurs zones colorées qui concrétisent la position des protéines. Elles sont ensuite de nouveau séchées à l'étuve à 80° C pendant vingt minutes et peuvent alors être conservées pendant de longs mois sans altération notable si elles sont à l'abri de la lumière. Etant donné le nombre considérable d'électrophorèses réalisées (plusieurs milliers), un bon moyen de classification nous a paru être leur agrafage par neuf à l'intérieur d'une double feuille protectrice qui porte la numérotation. Ce système permet de retrouver rapidement n'importe quelle bande en parfait état.

La coloration au bleu de bromophénol est d'un emploi facile et rapide, mais présente l'inconvénient d'une affinité variable vis-à-vis des différentes fractions protéiques et d'une stabilité médiocre à la lumière.

— *Amidoschwarz 10 B.* — Dans certains cas, nous avons été amené à préférer à la coloration au bleu de bromophénol, celle à l'amidoschwarz 10 B qui a été utilisée suivant la technique de W. GRASSMANN et K. HANNIG (1952). Après séchage, les bandes sont immergées pendant dix minutes dans une solution saturée du colorant dans le méthanol acétique. La décoloration du fond s'obtient par des bains successifs de méthanol acétique à 10 %.

b) *Coloration des glycoprotéides.*

Pour mettre en évidence ces substances, nous avons utilisé la technique de G. GOMORI (1952) et R. D. HOTCHKISS (1947) suivant le procédé de E. KOIW et A. GRONWALL (1952), modifié par J. M. FINE et Coll. (1956).

Cette méthode est basée sur le principe d'une oxydation des polysaccharides portés par les glycoprotéides, au moyen de l'acide périodique, en polyaldéhydes qui recolorent la fuchsine décolorée de Schiff.

Rappelons la composition et la préparation des réactifs :

1° Acide périodique	6 g
Eau distillée	150 ml
Acétate de Na M/5	75 ml
Ethanol	500 ml
Se conserve à + 4° C	
2° Fuchsine basique	2 g
Eau distillée bouillante	400 ml
Laisser refroidir, puis ajouter	
HCl 2N	10 ml
Métabisulfite de K (RP)	4 g

Boucher et laisser pendant une nuit à l'obscurité et à + 4° C. Mélanger à 1 g de charbon activé pulvérisé. Filtrer. Ajouter 30 ml d'HCl 2N. Le liquide se décolore progressivement et doit être conservé en flacon bouché à l'émeri à + 4° C. Au moment de l'emploi, ce réactif est dilué avec un volume égal d'éthanol à 95°. Cette modification rend la réaction plus sensible.

3° Eau distillée de rinçage :	
Eau distillée	100 ml
HCl concentré RP	10 ml
Métabisulfite de K (RP)	4 g
A conserver soigneusement bouchée.	

Pour la coloration, les bandes séchées à 37° sont rincées à l'alcool absolu, puis immergées pendant cinq minutes dans un bain d'acide périodique. Elles sont ensuite rincées à l'aide du premier bain alcoolique additionné du quart de son volume de solution sulfitée. Suivent une coloration pendant quarante-cinq minutes dans la solution de fuchsine, puis cinq lavages de cinq minutes dans la solution sulfitée de rinçage. Les bandes sont enfin déshydratées par deux bains d'éthanol pur et, après essorage sous papier filtre, séchées à l'air. Les glycoprotéines sont colorées d'un beau rouge légèrement violacé.

c) Coloration des lipoprotéines.

Elle consiste à employer un colorant qui se fixe, non sur les protéines elles-mêmes, mais sur les lipides qui leur sont associés sous forme de cénapses.

Nous avons utilisé la technique de B. SWAHN (1953) en remplaçant le noir Soudan par du noir Cérol B.

Colorant : Noir Cérol B	0,5 g
Ethanol	250 ml
Eau distillée	250 ml

Le noir Cérol B est dissous dans un peu d'éthanol pur puis complété à 250 ml. L'eau distillée est ajoutée peu à peu sous agitation. Le mélange subit ensuite une ébullition sous reflux de 45 minutes, puis il est refroidi et filtré.

Pour la coloration, les bandes sont immergées pendant une heure dans le colorant qu'il est bon d'agiter de temps à autre. Après essorage sous papier filtre, elles sont séchées à l'air. Les lipoprotéines prennent une coloration noire alors que le fond reste légèrement gris. Les protéines dépourvues de lipides ne sont pas colorées.

7. *Photométrie.*

Les protéines mises en évidence par l'une des techniques décrites ci-dessus présentent une coloration plus ou moins intense suivant leur abondance et peuvent donc être évaluées par photométrie. Le principe et le mécanisme de ces mesures ont été exposés lors de la description de l'appareillage. Le résultat tangible en est une courbe ondulée dont les différents sommets correspondent aux taches colorées du papier, donc aux fractions protéiques.

Si nous nous sommes servi de ce dispositif pour tracer un certain nombre de courbes et garder ainsi une trace immuable de ces documents, nous n'avons jamais accordé à la méthode de valeur quantitative rigoureuse et nous tenons à expliquer pourquoi.

A notre avis, malgré la meilleure sélection, le papier filtre n'a jamais une trame parfaitement régulière et constante, et ces hétérogénéités se répercutent dans la vitesse de migration des fractions comme dans leur étalement. De plus, malgré le meilleur entraînement et les artifices employés, il est difficile de faire le dépôt initial du sérum d'une façon rigoureusement reproductible, donc d'obtenir des taches identiques. Il faut souligner aussi que la migration constatée des fractions n'est que la résultante du déplacement électrophorétique réel et de facteurs très variables, peu contrôlables, tels que l'évaporation et l'électro-endosmose. Finalement, comme nous l'avons déjà fait remarquer, toutes les molécules protéiques ne fixent pas le colorant avec la même affinité et il n'y a pas forcément proportionnalité rigoureuse entre l'intensité des taches et leur teneur en protéines. Si, en sérologie humaine, cet obstacle a été en bonne partie éludé par l'étude précise des affinités tinctoriales de l'albumine et des diverses globulines, suivie de l'élaboration de facteurs correctifs, aucun travail analogue n'a été fait pour les constituants de l'hémolymphe des Crustacés. Jusqu'à sa réalisation, toutes les estimations quantitatives qui ont pu être faites n'auront aucun caractère de certitude.

Sans exclure de telles mesures que nous réservons pour des recherches futures et pour lesquelles la gélose sera un support beaucoup plus approprié que le papier, nous nous sommes contenté, dans le présent travail, d'une évaluation tout à fait approximative de l'intensité des taches, avec emploi d'une terminologie relative comportant des qualificatifs comme « tache forte » ou « moyenne » ou « faible ». Bien que très personnelles et approchées, de telles qualifications se sont avérées suffisantes pour l'étude surtout qualitative qu'a comportée ce travail.

8. *Essais comparatifs avec d'autres appareils.*

Si la plupart de nos essais ont été faits avec l'appareil qui a été décrit, nous avons tenu à faire des essais comparatifs avec d'autres dispositifs d'un principe parfois différent.

C'est ainsi que nous nous sommes servi de l'appareil Elphor qui donne des séparations mieux délimitées et plus régulières, grâce sans doute au papier à trame plus fine qui est fourni avec ce modèle (Schleicher et Schull). Du point de vue qualitatif, nous n'avons recueilli aucune information nouvelle.

Nous avons aussi examiné le comportement des protéines du sérum de *Carcinus maenas* dans une cuve Lerès construite pour la technique de microrhéoelectrophorèse de Machebœuf.

On sait que dans ce procédé le papier n'est plus horizontal mais tendu « en toit » sur un chevalet à tranche fine. Le mélange à analyser se dépose au sommet. L'évaporation n'y est plus contrariée, mais contrôlée grâce à un couvercle cylindrique perforé. Elle provoque ainsi, dans chaque moitié de la bande, un courant hydraulique ascendant qui s'ajoute ou s'oppose au mouvement électrophorétique propre, si bien qu'au bout d'un certain temps les différentes fractions atteignent des positions d'équilibre définitives. La séparation est plus rapide, car le courant utilisé est plus important. Les figures électrophorétiques obtenues ont été bonnes, mais n'ont apporté aucun élément nouveau. Nulle fraction supplémentaire n'est apparue.

Finalement, nous avons aussi utilisé la cuve à usages multiples que nous avons mise au point et que nous décrirons en détail par la suite. Les résultats ont été conformes à ceux obtenus avec les autres dispositifs.

D. — Organisation générale des essais.

En 1954, nos essais préliminaires ayant permis d'adapter, pour la première fois, l'électrophorèse sur papier à l'étude de l'hémolymph de *Carcinus maenas*, tout en montrant son intérêt dans ce domaine, une investigation systématique est entreprise à la Station biologique de Roscoff, au cours de la même année, afin de dégager sur un matériel choisi au hasard, les règles qui régissent la présence et les variations des fractions protéiques observées. Elle est poursuivie, en 1954 et 1955, à l'Institut de Biologie de Nancy, sur des Crabes en élevage gardés pendant plusieurs mois et soumis à plusieurs électrophorèses consécutives. Un nouveau séjour à la Station biologique de Sète durant l'été 1955 a pour but la recherche d'éventuelles différences entre les Crabes indemnes et les animaux sacculinés. Un second séjour en ces mêmes lieux, en 1956, a permis l'étude des femelles en vitellogenèse ou ayant pondu. Finalement, de 1957 à 1958, un travail statistique comportant une soixantaine d'électrophorèses par mois sur un matériel régulièrement envoyé de Roscoff, nous permet de dégager certaines variations saisonnières.

Nous examinerons en détail chacune de ces séries d'essais pour en tirer finalement des conclusions générales.

E. — Résultats.

1. Essais préliminaires.

Ils datent du printemps 1954 et portent sur un lot restreint d'une dizaine d'animaux ♂ et ♀, normaux et parasités, tous originaires de Roscoff.

Ils permettent d'établir la quantité optima de sérum à mettre en œuvre (10 à 20 microlitres), le voltage le plus favorable (110 - 150 V), ainsi qu'une durée suffisante des électrophorèses (6 à 7 h. ou 10 à 11 h.).

Ils montrent que le dépôt du sérum sous forme de gouttes ne donne que des figures peu constantes et qu'il faut lui préférer le système du dépôt linéaire plus lisible et plus fidèle, bien qu'encore entaché d'une certaine variabilité.

Ils indiquent surtout que le sérum de *Carcinus maenas* renferme plusieurs groupes protéiques de mobilités différentes, que le nombre et l'intensité de ceux-ci varient suivant les états physiologiques ou pathologiques, donc qu'il est du plus haut intérêt de préciser les modalités de ces variations. C'est ce qu'ont essayé de faire les essais ultérieurs.

2. Variations électrophorétiques des protéines du sérum d'un échantillon de population de *Carcinus maenas* de la Manche.

126 électrophorèses ont été faites à la Station biologique de Roscoff dans la période du 14 juillet au 26 août 1954. Les Crabes, pêchés par les soins de la Station ou ramassés sur la grève sont gardés en élevage individuel et nourris de Moules tous les deux jours.

Une première précaution consiste à contrôler si deux fractions égales d'un même sérum soumises à l'électrophorèse sur deux bandes séparées dans la même cuve, dans des conditions rigoureusement identiques, donnent des résultats comparables. Les deux courbes obtenues par photométrie ont bien la même allure générale, indiquent la même composition qualitative, mais ne sont pas exactement superposables, ce qui montre qu'il serait illusoire d'en attendre des comparaisons quantitatives précises.

Nous avons constaté aussi, en faisant une première électrophorèse sur trois animaux, puis une seconde sur les mêmes individus deux jours plus tard, que ces prises de sang consécutives à de courts intervalles ne modifient pas la composition qualitative et quantitative des protéinogrammes dans une mesure dépassant la variabilité expérimentale démontrée par l'essai précédent.

a) Description des fractions.

A première vue, les figures électrophorétiques de l'ensemble des animaux étudiés présentent une variabilité déconcertante. Certaines bandes sont à peine colorées et dénotent l'absence presque totale de protéines. D'autres portent une tache nette et éloignée de la ligne de départ ; d'autres encore révèlent deux taches, l'une distale comme la précédente, et la seconde un peu plus proche de la ligne de dépôt ; une troisième catégorie enfin se caractérise par trois taches : les deux précédentes et une troisième assez voisine du start. En outre, l'intensité relative de toutes ces taches varie grandement d'un individu à l'autre.

Il en ressort néanmoins l'existence d'au moins trois groupes protéiques dans l'hémolymph de *Carcinus maenas* (fig. 13, page 96). A défaut de critères plus valables et pour ne pas recourir à la formule injustifiée qui consiste à dénommer des fractions inconnues d'après leur position comparée à celle des constituants du sérum humain analysé dans les mêmes conditions, nous les désignons à titre provisoire d'après leur situation par rapport à la ligne de départ : D = fraction distale ; I = fraction intermédiaire ; P = fraction proximale. Ce qui n'empêche d'ailleurs pas de comparer leur migration à celle des protéines du sérum humain et d'établir que D est plus rapide que la sérumbumaine humaine, que I se situe au niveau des α_1 globulines et que P se place, à hauteur des γ globulines.

D est manifestement la fraction la plus fréquente et la plus constante. Elle apparaît à peu près dans toutes les électrophorèses qui révèlent un minimum de protéines. Son intensité est variable, mais en général, elle est la plus importante des trois fractions. Dans l'ordre des fréquences vient ensuite la tache I qui se manifeste souvent par des traces à peine visibles, mais peut aussi atteindre et même dépasser l'importance de D. Finalement, la fraction P est celle qui appartient au nombre le plus restreint d'animaux, mais son intensité est parfois considérable. Il faut veiller à ne pas la confondre avec une tache de position similaire, bien qu'un peu moins rapide, qui apparaît quelquefois

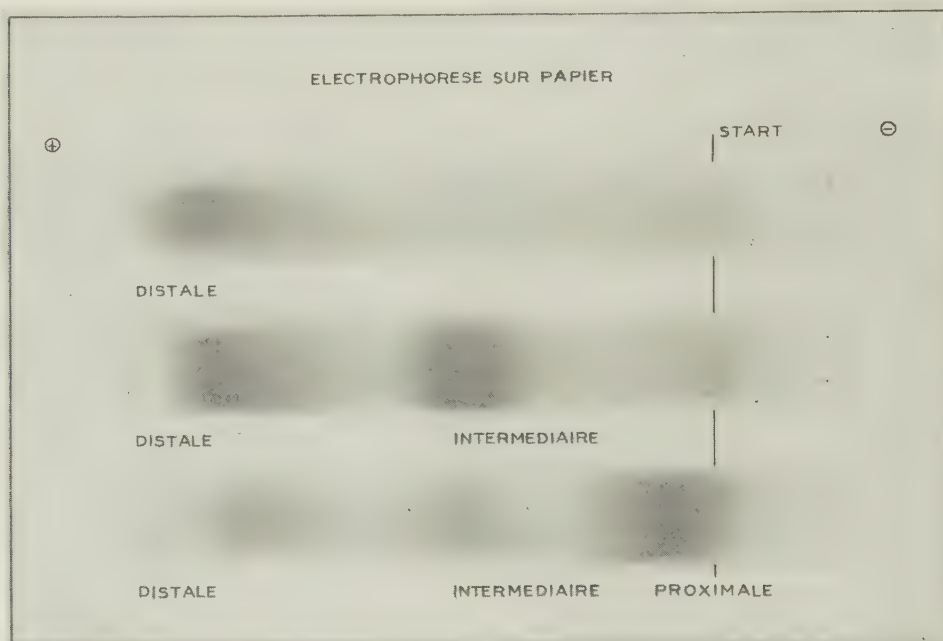


FIG. 13. — Electrophorèse sur papier de trois sérums de Crabes révélant les trois fractions protéiniques D, I, P.

lorsque la pipette servant au dépôt du sérum a entraîné par inadvertance des fragments du gâteau superficiel coiffant le sérum dans le tube à centrifuger. Comme nous l'avons déjà suggéré, il s'agit sans doute là de protéines dénaturées par la formation d'une mousse dans la seringue de prélèvement. En tous cas, l'aspect particulier de cette tache permet de la distinguer facilement des fractions électrophorétiques vraies.

De la grande confusion et de la variabilité de ces fractions, nous avons essayé de dégager un déterminisme sommaire. Pour faciliter cette tâche, il a d'abord fallu éliminer l'influence possible de l'âge en opérant surtout sur des Crabes adultes (30 à 40 mm) ; puis celle de la nourriture en maintenant pour tous les animaux un régime alimentaire unique et constant. De plus, afin de contrôler les facteurs les plus probables pouvant être liés à la protéinémie, pour chaque individu ont été notés les caractères morphologiques et physiologiques déjà signalés plus haut.

Pour l'obtention plus aisée d'une vue d'ensemble des résultats et pour faciliter leur interprétation, nous nous sommes servi d'un système d'abréviations qui fait suivre l'ini-

tiale de la fraction par le signe de sa valeur semi-quantitative : F = forte ; M = moyenne ; f = faible ; le sens de l'un ou de l'autre de ces signes pouvant être renforcé par un ou plusieurs traits de soulignement.

C'est ainsi que la formule :

$$\text{ER 16 A} = \text{DF} + \text{If} + \text{Pf}$$

signifie que, dans l'électrophorèse faite à Roscoff sur la bande n° 16 A, ont été trouvées une fraction distale forte, une intermédiaire faible et une proximale très faible.

Pour l'examen de ces résultats, seront successivement considérés les Crabes ♂ et ♀, et dans chacune de ces catégories, différents sous-groupes.

b) *Etude des mâles.*

— *Mâles normaux.*

Sous cette désignation, sont groupés tous les Crabes ♂ qui, à la dissection, se sont révélés indemnes de toute racine de Sacculine et de toute affection pathologique décelable à l'œil nu ou à la loupe. Pour chacun des 35 individus de cette catégorie, l'étape de l'intermue a été déterminée par le système de repérage de DRACH.

L'ensemble des électrophorèses montre que :

— En A₁ et A₂, la quantité totale des protéines présentes est très faible et n'apparaît que sous forme d'une distale peu nette. Ce taux très abaissé s'explique par la dilution considérable du milieu intérieur par absorption d'eau après l'exuviation

— L'étape B n'est pas représentée dans cet échantillon.

— En C₁, C₂, C₃, la fraction D devient plus nette et dans quelques cas, on voit apparaître une fraction I d'intensité moyenne.

— En C₄, étape qui concerne la majeure partie des animaux, la bande distale devient forte, à part quelques exceptions qui ont surtout trait au début de cette étape, alors que la couche membraneuse est encore très mince. La plupart du temps I fait défaut ; ce groupe n'apparaît que dans quelques cas où il peut d'ailleurs acquérir une forte intensité. Dans trois cas seulement, il existe une fraction P très faible ou même douteuse.

— Les étapes D₁, D₂, D₃ et D₄ n'ont pas été trouvées dans ce lot.

Ces observations peuvent être résumées en disant que, pendant les étapes immédiatement consécutives à l'exuviation, les protéines sont très diluées dans l'hémolymph et que la faiblesse de ce taux ne permet pas d'y caractériser plusieurs fractions. Par la suite, la fraction D devient importante, notamment au cours des subdivisions de la période C où elle se trouve quelquefois accompagnée de la fraction supplémentaire I. Cette situation se renforce en particulier en C₄, étape d'un relatif repos physiologique, bien que sa présence soit encore inconstante. L'existence de P paraît douteuse.

— *Mâles sacculinés.*

— *A Sacculine interne.* — Le seul Crabe de cette définition se caractérise par la formule DF + IM. De cet exemplaire unique, on ne peut naturellement tirer aucune conclusion, si ce n'est que la fraction I peut être présente chez de tels animaux.

A Sacculine externe. — Parmi neuf individus, trois révèlent une distale forte et six une distale moyenne. Dans deux cas seulement, on trouve une fraction intermédiaire forte. Il semble donc que la fraction distale soit diminuée chez ces mâles sacculinés. Le groupe I peut y exister, mais paraît dans l'ensemble moins fréquent et moins important que chez les Crabes normaux. Donc, comme on pouvait s'y attendre, le milieu intérieur se trouve affaibli dans sa composition protéique par l'action de la Sacculine.

— *Mâles privés de leurs pédoncules oculaires.*

Nous avons recherché si l'ablation des pédoncules oculaires et la privation glandulaire qu'elle entraîne avaient un retentissement sur le métabolisme protéique des mâles. A cet effet, l'électrophorèse du sérum de quatre mâles normaux a été faite avant l'ablation, puis une nouvelle électrophorèse a suivi dix ou trente-six jours après l'opération.

Avant l'ablation, un seul animal présentait une intermédiaire faible. Après l'opération, celle-ci est devenue commune à tous les individus. Là où elle n'existait pas, elle est apparue, faible. Dans le cas où elle était déjà présente, elle s'est renforcée pour devenir très nette. De même, lorsque la fraction D était faible ou moyenne chez les individus intacts, elle s'est intensifiée après l'opération. Dans deux cas aussi a été notée une proximale très faible.

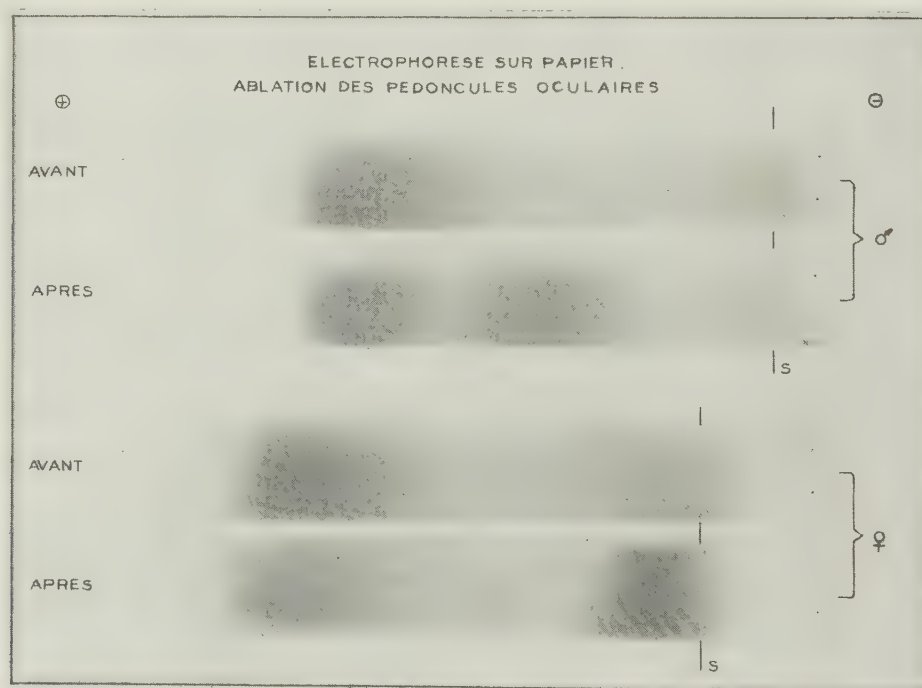


FIG. 14. — Electrophorèse sur papier du sérum de Crabes ♂ et ♀, avant et après ablation des pédoncules oculaires.

Il semble donc que l'ablation des pédoncules oculaires des Crabes ♂ normaux provoque chez ceux-ci un enrichissement qualitatif et quantitatif de l'hémolymphe en protéines (fig. 14 ci-dessus), enrichissement qui se manifeste par le renforcement de D, l'appari-

tion ou l'intensification de I, et, d'une manière moins certaine, par l'apparition de P. Ces faits cadrent bien avec l'activation connue du métabolisme général des Crabes par l'ablation des pédoncules oculaires.

c) *Etude des femelles.*

— *Femelles normales.*

Ont été groupées sous ce qualificatif toutes les femelles ne présentant aucune racine de Sacculine et ne portant pas de ponte. Le lot examiné comporte trente-huit individus. Une grande attention a été portée à l'observation des ovaires. On sait que ceux-ci sont translucides ou blancs à l'état immature ou non fonctionnel. Par contre, une teinte jaune peut être interprétée comme un début de vitellogenèse et l'accentuation de cette teinte avec passage à l'orange ou même au rouge, comme l'accumulation des réserves lipidiques dans les ovules.

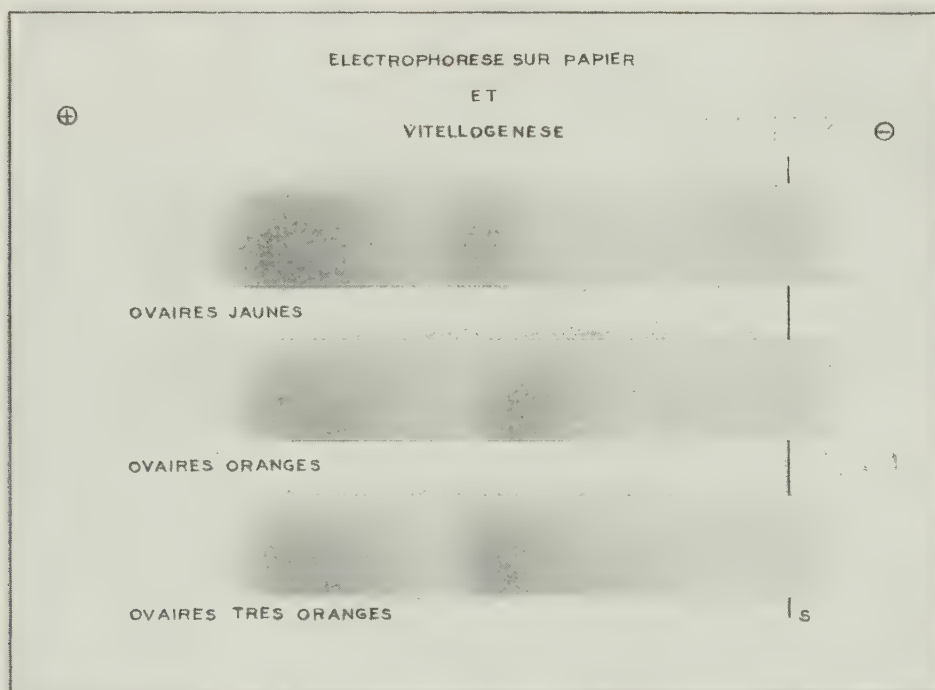


FIG. 15. — Electrophorèse sur papier du sérum de Crabes ♀ en vitellogenèse croissante.

Les électrophorèses montrent que, dans ce groupe comme dans celui des mâles, la quantité de protéines décelable sur le papier est très faible aux stades immédiatement consécutifs à la mue. Par contre, en C₁, C₂, C₃, bien qu'encore très variable, cette teneur se rapproche peu à peu de la normale vers la période D. La fraction I n'y a cependant pas été rencontrée.

En C₄, la fraction D se stabilise nettement, observation conforme à celle qui a été faite chez les mâles. A cette étape, la fraction I paraît plus fréquente et plus marquée chez les femelles, ce qui fait penser qu'elle peut être plus ou moins liée à la vitellogenèse. Pour essayer de le confirmer, comparaison a été faite des électrophorégrammes (fig. 15, ci-dessus) de trois femelles dont la première avait des ovaires jaunes, la seconde des

ovaires légèrement oranges et la troisième des gonades d'une teinte orange très vive. On peut constater que la tache représentant la fraction I est de plus en plus accentuée dans le sens d'une vitellogenèse croissante. Ceci est conforme à notre supposition. Cependant, il faut s'empresse de souligner que le fait est loin d'être général, que des ovaires très colorés peuvent aussi correspondre à la seule fraction D, de même que I peut exister lorsque les ovaires sont parfaitement blancs. Cet exemple précis montre combien, dans ce domaine, il faut se garder de généralisations hâtives.

Quant au groupe protéique P, il est beaucoup plus fréquent chez les femelles (une fois sur trois) que chez les mâles où l'on peut même douter de son existence. Très souvent, cette fraction correspond à des ovaires oranges, mais ici encore, la constatation n'a pas valeur absolue, car il est des Crabes aux ovaires en vitellogenèse très avancée sans que P soit décelable.

En résumé, dans l'échantillon de femelles examiné, la composition protéique de l'hémolymph parait caractérisée par la présence de trois groupes fondamentaux de ces substances : le groupe D presque toujours abondant ; le groupe I plus net et plus fréquent que chez les mâles homologues ; le groupe P, fréquent et indiscutable chez la plupart des individus en vitellogenèse avancée.

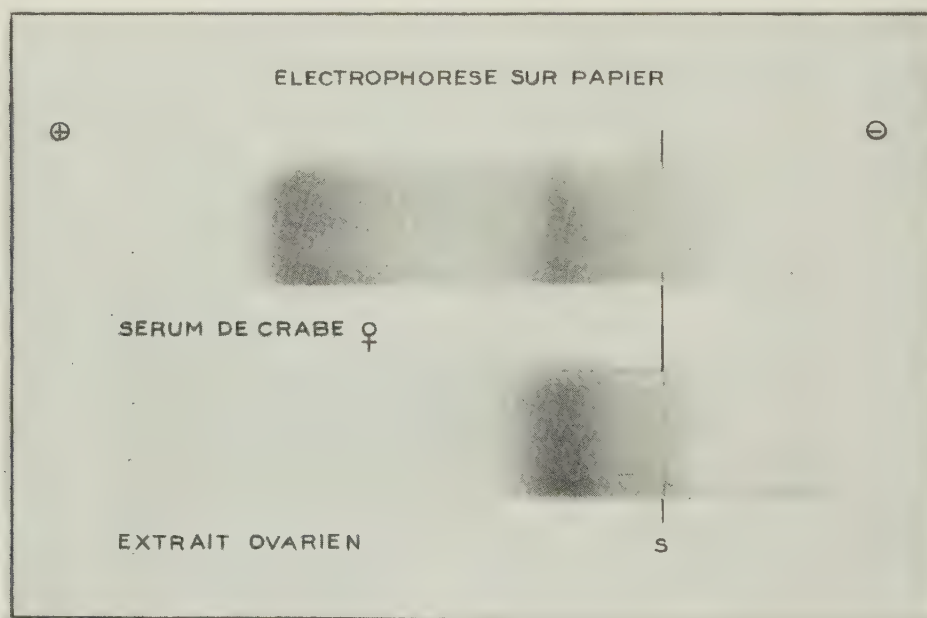


FIG. 16. — Electrophorèse sur papier d'un sérum de Crabe ♀ en vitellogenèse et d'un extrait d'ovaire en vitellogenèse.

Une tentative a été faite pour établir si les protéines ovariennes correspondaient à celles de P. Pour cela, un ovaire de teinte jaune orange a été broyé dans un tube à centrifuger en présence du tampon employé pour les électrophorèses. Après un séjour de vingt-quatre heures à la glacière, cette suspension a été centrifugée et 20 microlitres du surnageant ont été soumis à une électrophorèse dans les conditions habituelles. La coloration de la bande révèle alors une tache d'intensité moyenne située à proximité de la ligne de dépôt, donc en position analogue à celle de P (fig. 16 ci-dessus). On peut en

conclure que l'ovaire en vitellogenèse renferme des substances solubles dans le tampon employé, colorables au bleu de bromophénol, donc probablement de nature protéique, et de même mobilité électrophorétique que la fraction P de l'hémolymph.

— *Femelles normales origères.*

L'échantillon examiné qui date, on s'en souvient, du mois d'août à Roscoff, ne comporte que deux individus de cette catégorie. Le premier possède une distale faible, l'autre une distale forte. Nous nous garderons de tirer une conclusion quelconque d'un effectif aussi réduit.

— *Femelles à Sacculine externe.*

Les 10 Crabes étudiés sont ou ont été porteurs d'une Sacculine externe. La largeur des sacs viscéraux varie de 9 à 20 mm. Dans trois cas, le parasite externe est tombé et seule la cicatrice abdominale mélanisée témoigne extérieurement de son existence.

L'ensemble de ces femelles est caractérisé par l'unique présence d'une fraction distale faible. La présence d'un parasite adulte semble donc affecter de façon assez sensible la composition protéique de l'hémolymph des hôtes ♀ chez lesquels elle empêche en général l'apparition des fractions I et P, tout en atténuant D. L'agression paraît ainsi plus marquée que chez les mâles.

— *Femelles sans pédoncules oculaires.*

La méthode employée a été analogue, mais plus détaillée que celle utilisée pour l'étude des mâles aveugles. En effet, après l'électrophorèse antérieure à l'ablation des pédoncules oculaires, les analyses ont été répétées trois fois à des intervalles de 2, 5 et 10 jours.

Au départ, l'une des femelles se caractérisait par une distale forte. Cinq jours plus tard apparaissait une proximale faible dont l'intensité devenait moyenne au bout de dix jours. Par contre, la fraction D s'affaiblit, un peu comme si la formation de I se faisait à ses dépens.

Deux autres femelles, déjà pourvues des trois fractions D, I et P avant l'opération, ont marqué une nette augmentation de P, surtout au cinquième et au dixième jour. Dans l'un des cas, cet accroissement paraît encore se faire aux dépens de D.

Un dernier individu, qui ne révélait au départ que DF + IM, montre au bout de dix jours le supplément d'une proximale très nette.

De ces essais, on retiendra que le sérum des femelles ayant subi l'ablation des pédoncules oculaires se caractérise par l'apparition ou par l'accentuation des fractions I ou P, accompagnées, dans certains cas, d'une diminution concomitante de D.

d) *Conclusions.*

D'après cette série expérimentale, on peut affirmer que :

— L'électrophorèse du sérum des Crabes ♂ normaux met en évidence deux fractions protéiques D et I.

— Ces mêmes fractions se retrouvent chez les femelles normales, mais une fraction supplémentaire P caractérise en général ces dernières au moment de la vitellogenèse.

— Dans les deux sexes, la figure électrophorétique du sérum varie avec l'étape du cycle d'intermue. Aux stades A₁ et A₂, les protéines très diluées ne se manifestent que par la seule distale affaiblie. En C₁, C₂ et C₃, les électrophorégrammes se rapprochent progressivement de la normale par renforcement du groupe D et apparition de I dans certains cas. Cette évolution se poursuit durant la longue étape de repos C₄ où, néanmoins, I peut encore faire défaut. L'étude des étapes D₁, D₂, D₃ n'a pu être faite dans cette série.

— Dans les deux sexes, la présence d'une Sacculine externe diminue le taux des protéines, ne laissant subsister la plupart du temps qu'une fraction D affaiblie.

— L'ablation des pédoncules oculaires produit, dans des délais relativement courts, d'importantes modifications du métabolisme protéique des animaux opérés. Chez les mâles lorsque la fraction I fait défaut, elle apparaît ; lorsqu'elle est présente, son importance augmente. Chez les femelles, on note un mécanisme analogue, mais il concerne aussi la fraction P, du moins à cette époque de l'année. Il est possible que ces transformations se fassent aux dépens de D.

— Les ovaires renferment des substances protéiques de même mobilité électrophorétique que celles qui constituent la fraction P.

Ces résultats ont été obtenus à partir d'un échantillon de population choisi au hasard à une époque déterminée de l'année, les animaux étant sacrifiés immédiatement après l'analyse. Nous avons tenu à les approfondir et à les compléter en soumettant le sérum de Crabes en élevage à des électrophorèses successives échelonnées sur plusieurs mois.

3. Variations électrophorétiques du sérum de *Carcinus maenas* en élevage.

a) Généralités.

Ces recherches ont porté sur 48 Crabes ♂ dont les 27 premiers étaient originaires de Roscoff, les 21 autres de l'Etang de Thau. Elles ont aussi concerné 24 femelles, toutes en provenance de Roscoff.

Une partie des animaux a été mise en élevage en octobre 1954, une autre en janvier 1955 et certaines femelles en mai 1955. Tous ces Crabes ont été élevés dans l'installation nancéienne, régulièrement nourris de Moules, de Crevettes ou de Poissons. Dans l'ensemble, ils se sont bien adaptés aux conditions d'élevage et ont mué normalement. Les femelles ont pondu en captivité et mué par la suite. Certains individus n'ont été disséqués qu'après huit mois d'élevage. D'autres sont cependant morts avant, ou ont pu s'échapper. Les prises de sang ont toujours été minimales, de manière à léser le moins possible les donneurs. Certains sujets ont supporté six prises étalées sur six mois et ne sont morts qu'à la dissection.

Ici encore, nous considérerons successivement les individus ♂, puis les femelles.

b) Etude des mâles normaux.

Les animaux de ce sexe sont désignés par numérotation romaine.

Les Crabes I à VII, originaires de Roscoff, ont été mis en élevage en octobre 1954. Les premières électrophorèses sont faites en janvier 1955. Toutes révèlent une fraction D

forte. Une seule comporte la fraction I, très faible. Dans ce lot, un individu unique a mué. Il ne présente la fraction I, ni deux mois, ni même un jour avant l'exuviation. Force est donc d'admettre que la mue est possible sans la présence des protéines du groupe I, avec cette restriction que, le Crabe étant mort le lendemain, la mue a pu être anormale.

Les 20 Crabes VIII à XXVII, originaires de Roscoff, mesurant de 30 à 35 mm, ont été pêchés et mis en élevage en janvier 1955. 19 d'entre eux présentent la fraction I qui est en général intense. La seule exception est un animal qui a mué quatre jours avant la première électrophorèse, ce qui, à la lumière des données déjà acquises, explique le cas. On peut donc retenir qu'au mois de janvier tous les Crabes ♂ de Roscoff de cette taille présentent la fraction I.

De ces 20 Crabes, 8 ont mué en élevage et, compte tenu de l'exception citée, tous ceux qui l'ont fait sont porteurs de I. Après l'exuviation, cette fraction s'affaiblit ou disparaît, mais le rythme de cette régression n'a rien de régulier. Une fois dépassée l'atténuation temporaire des premiers jours consécutifs à la mue, l'affaiblissement des protéines de I paraît s'étaler sur plusieurs mois.

Notons aussi que cette fraction peut persister pendant de longs mois sans qu'intervienne aucune mue. C'est ainsi que 3 Crabes ont vécu six mois, gardant en permanence une tache I forte sans jamais muer. Ce fait démontre que I n'est pas strictement lié à la période D du cycle d'intermue, mais s'étale également sur la période C. Une telle constatation concorde avec celle de E. ZUCKERKANDL (1958) qui note que, chez *Maia squinado* R. la fraction 3 (= fraction I de notre système) se présente dès C₄ dans certains cas. Pour le reste, ces essais confirment en tous points ceux obtenus par les électrophorèses faites à Roscoff.

Parmi les 21 mâles (N^{os} XXVII à XLVIII), originaires de l'Etang de Thau et pêchés au mois de mai, aucun ne présente la bande I. La causalité de cette absence n'apparaît pas clairement. Peut-être s'agit-il d'une variation saisonnière, point de vue étayé par le fait qu'aucun des animaux n'a mué. 9 d'entre eux ont subi l'ablation des pédoncles oculaires, mais chez aucun d'eux, l'opération n'a fait apparaître la fraction I dans les six ou huit jours consécutifs, comme cela avait été le cas pour les Crabes d'été à Roscoff. Il est donc possible qu'il existe chez ces animaux des périodes où le métabolisme protéique ne réagisse que peu à la suppression des pédoncles oculaires et des complexes glandulaires qu'ils renferment. Cependant, rien d'absolu ne peut encore être affirmé à ce sujet.

c) *Etude des femelles normales.*

Les 28 animaux de cette série sont originaires de Roscoff. Les 11 premiers ont été pêchés en octobre 1954, les 17 autres en janvier 1955.

Avant d'examiner les résultats des électrophorèses, relevons quelques constatations curieuses au sujet des pontes de ces femelles

— *Remarques biologiques concernant la ponte.*

Dans le premier groupe, 8 individus ont pondu une ou plusieurs fois, sans jamais muer au cours de la période d'observation. Dans le second groupe, 10 animaux ont pondu une ou plusieurs fois et 3 ont mué après avoir pondu. Fait remarquable : parmi

les 18 femelles ayant ainsi pondu, 5 l'ont fait deux fois et 1 l'a fait trois fois. Or, *Carcinus maenas* en liberté est réputé ne pondre qu'une fois par an, contrairement à ce qui se passe chez l'espèce *Pachygrapsus marmoratus* Fabricius (G. VERNET-CORNUBERT, 1958) où plusieurs pontes peuvent se succéder. Faut-il rechercher l'origine de ce phénomène dans les conditions d'élevage ? Il ne nous semble pas, car N. DEMEUSY (1958) a réalisé de nombreux élevages dans des conditions analogues sans jamais relever de pontes multiples. Signalons toutefois que ces émissions répétées d'ovules ont été constatées par N. DEMEUSY et R. LENEL (1954) chez les Crabes privés de leurs pédoncules oculaires. Ces auteurs ont étudiés une centaine de femelles ayant subi cette opération. Toutes ont mué une fois, et la plupart ont pondu une fois, trois d'entre elles ont pondu deux fois, deux l'ont fait trois fois et un sujet a même pondu quatre fois. De ces chiffres, il ressort que les pontes multiples ont eu lieu chez 6 % des animaux; alors que dans nos observations ce pourcentage atteint 30 %.

Quelle peut être la cause de ces pontes répétées chez nos animaux ? Les conditions d'élevage étant exclues, la seule explication actuellement entrevue est une stimulation de la fonction ovogénique par les prises d'hémolymphes renouvelées. Seuls, des essais à grande échelle pourront décider de la validité de cette hypothèse. D'ores et déjà, on peut remarquer que toutes les femelles à ponte multiple ont subi au moins quatre prises; certaines en ayant même supporté six. Une observation va néanmoins à l'encontre de notre hypothèse : 2 Crabes ayant subi chacun six prises n'ont pondu qu'une seule fois, de janvier à juillet.

Nous avons également calculé la durée des intervalles qui séparent les diverses pontes d'une même femelle. Chez les Crabes à deux pontes, ces laps de temps ont été respectivement 70 jours, 89 jours, 72 jours, 45 jours et 57 jours. Chez le sujet ayant pondu trois fois, ces intervalles ont été de 50, puis 51 jours. Les premières pontes ont eu lieu en janvier (4) ou février (2). Les secondes se situent en mars (3) ou avril (3). La troisième ponte a eu lieu en mai. En conséquence, on peut dire qu'en moyenne deux pontes consécutives sont séparées par un intervalle de 50 à 60 jours.

Un calcul analogue nous a donné une idée du temps qui s'écoule entre une ponte et la mue consécutive. Parmi les 17 femelles de janvier, trois ont mué : deux d'entre elles, après avoir pondu deux fois, la troisième après une ponte unique. Les mues se situent à la même époque, l'une en juin, les deux autres en juillet. Elles ont donc lieu respectivement à 59, 108 et 162 jours après les pontes. N. DEMEUSY (1958), gardant en élevage, pendant près d'un an, 12 femelles, obtient une ponte unique de trois d'entre elles. Les intervalles séparant ces pontes de la mue suivante sont trois, six et trois mois. Ces observations révèlent, comme les nôtres, une assez grande variabilité des délais; on peut, en définitive, admettre que la moyenne gravite autour de trois mois. Un tel intervalle, somme toute assez considérable, montre combien les processus de ponte et d'exuviation sont concurrentiels du point de vue métabolique et incompatibles dans des temps rapprochés.

Ces remarques biologiques faites, considérons maintenant ces Crabes ♀ du point de vue de la composition électrophorétique de leur sérum.

— Protéinogrammes.

Des 28 femelles soumises à l'analyse, 25 présentent, à un moment quelconque, une fraction P plus ou moins prononcée. Les trois autres cas représentent : une absence

totale de P, une électrophorèse illisible et une hémolymphes pauvre en protéines. On peut donc affirmer que, pratiquement, toutes ces hémolymphes ♀ comportent la fraction P, et si l'on se souvient que les 48 mâles homologues n'ont presque jamais révélé cette dernière, on peut considérer qu'ici encore, avec une probabilité élevée, les protéines de P sont caractéristiques des Crabes ♀.

L'étude de l'échantillon ♀ étudié précédemment à Roscoff avait suggéré l'existence d'un lien entre l'abondance de ces protéines proximales et la vitellogenèse. Les observations que nous venons de faire sur les animaux en élevage ne permettent pas de confirmer, d'une manière claire et indiscutable, une telle corrélation. En effet, certaines femelles chez lesquelles P est très important n'ont jamais pondu malgré cinq ou six mois d'élevage. Souvent, chez de tels animaux, ces protéines régressent, au contraire, d'une électrophorèse à l'autre. On peut alors supposer que cette diminution est précisément la cause de l'absence de ponte, mais cette nouvelle suggestion n'est guère valable car dans certains cas, des pontes ont eu lieu alors que P était très faible ou même inexistant.

Comme on le constate, dans ce domaine, toute généralisation hâtive et péremptoire paraît malvenue. A aucun moment, il ne faut oublier que l'on est en présence d'un matériel biologique dont la large variabilité se laisse difficilement encadrer dans des règles élémentaires. A chaque pas, se rencontrent des imprévus et des exceptions qui ont tôt fait de rendre incertaines les plus séduisantes hypothèses.

Un autre exemple précis rendra encore compte de cette variabilité. Chez 10 des femelles examinées, nous avons retrouvé la fraction I, d'une manière temporaire pour certaines. Nous savons déjà, malgré quelques restrictions, que cette fraction paraît indiquer une préparation à la mue. Sous cet angle, le cas de la femelle n° 15 est assez curieux à examiner. A la première électrophorèse, ce Crabe donne une formule $DF + IM + Pf$. Il semble donc se préparer à une exuviation et peut-être à une ponte. Effectivement, neuf jours plus tard une ponte a lieu, et dix-huit jours après celle-ci, une nouvelle électrophorèse révèle que la fraction I s'est maintenue et que P s'est renforcé. 43 jours après la première ponte, en survient une seconde et l'électrophorèse faite onze jours plus tard donne toujours une formule $DF + IM + PM$. Puis, après 46 jours, la fraction I disparaît complètement alors que P devient très intense. Une mue a lieu trois jours après cette analyse, donc en l'absence de I. Ainsi, dans ce cas précis, P s'est renforcé après les pontes et I a disparu avant la mue. Dans de telles conditions, une conclusion définitive paraîtrait bien audacieuse, d'autant plus que, dans le même groupe, trois autres femelles ont mué sans présenter la fraction I.

d) *Conclusions.*

Pour résumer les apports de cette série expérimentale, nous dirons que les élevages individuels, couplés avec plusieurs électrophorèses consécutives sur les mêmes animaux, ont permis de faire un certain nombre de remarques intéressantes au sujet de la ponte, tout en confirmant partiellement les connaissances déjà acquises quant à la composition protéique de l'hémolymphes de *Carcinus maenas* en rapport avec la ponte et la mue. S'ils n'ont pas apporté une lumière totale et définitive dans ce domaine, ils ont souligné — si besoin en était — l'extrême complexité des phénomènes biologiques et ouvert la voie à de nouvelles recherches.

Le cas des Crabes sacculinés avait été abordé à Roscoff. Malheureusement, le nombre restreint des animaux parasités dont nous avons disposé dans ce lot — peut-être suffisant pour donner une première indication — ne l'était pas pour étayer des conclusions certaines. Nous avons donc repris des essais semblables à la Station biologique de Sète (1^{er} au 31 août 1955) où les Crabes sacculinés peuvent être obtenus facilement et où nous avons, en même temps, l'occasion de comparer une population méditerranéenne à celle de la Manche. C'est de ce travail que nous allons rendre compte à présent.

4. *Variations électrophorétiques des protéines du sérum d'un échantillon de population de Carcinus maenas de l'Etang de Thau.*

Comme dans les recherches précédentes, les animaux ont été partagés suivant le sexe et, dans les deux groupes, ont été étudiés, tour à tour, les individus indemnes et sacculinés.

a) *Etude des mâles.*

— *Mâles normaux.*

Ont été effectuées, dans les conditions habituelles, les électrophorèses de 33 Crabes ♂ de 19 à 45 mm ne présentant aucune racine de Sacculine à la dissection.

En ce qui concerne le cycle d'intermue, un individu est en C₁, un autre en C₂ et 29 sont en C₄. Le stade de l'un des animaux a été omis. A cette époque, la majeure partie des Crabes sont donc en C₄. Ceux qui se trouvent en C₁ et C₂ sont de petite taille.

Sans aucune exception, toutes les figures électrophorétiques obtenues se caractérisent par l'absence des fractions I et P.

Au stade inconnu, dans les deux stades C₁ et C₂, dans un stade C₄, la fraction D est faible. Dans un stade C₄ débutant et dans deux stades C₄ établis, cette même fraction est d'intensité moyenne. Dans tous les autres cas, soit chez 26 mâles en C₄, la bande distale est très forte.

On constate donc qu'au mois d'août, la majeure partie des mâles non parasités est au stade C₄ et présente une fraction distale intense. La composition protéique du sérum de ces animaux ressemble donc à celle du groupe homologue de Roscoff et se révèle même plus homogène.

— *Mâles sacculinés.*

Nous avons distingué ceux qui révèlent une Sacculine interne à la dissection, ceux qui portent un sac viscéral et ceux qui l'ont perdu, ainsi que le montrent une ou plusieurs cicatrices abdominales.

— *A Sacculine interne.* — Ont été réalisées les électrophorèses de 20 Crabes de 19 à 39 mm.

11 de ces animaux n'ont qu'une couche membraneuse mince et se trouvent donc au début de C₄. Huit sont nettement en C₄ et un seul en C₂. Tous les individus en C₄-début

ont une taille inférieure à 24 mm et paraissent, dans l'ensemble, peu parasités. Sans doute s'agit-il d'animaux ayant mué depuis peu et ayant peut-être été infestés par le parasite à cette occasion.

7 des 20 électrophorèses présentent une distale forte, 9 une distale moyenne, 3 une distale faible. Une seule analyse ajoute une fraction intermédiaire forte à une distale forte. Un examen plus détaillé des résultats montre que la fraction distale est importante surtout chez les animaux de grande taille, donc ceux qui ont probablement été le moins affectés par l'attaque parasitaire ou ont eu la possibilité de réagir contre elle. La plupart de ces Crabes sont d'ailleurs en C₄.

Les fractions D moyennes ou faibles sont les plus fréquentes dans ce lot, d'une part sans doute parce que les animaux venaient de muer récemment, et d'autre part, parce qu'ils avaient été affaiblis par la Sacculine. Comme on peut le constater, la fraction I est très rare chez de tels Crabes.

La comparaison de ces observations avec celles faites sur des mâles indemnes montre que, si la fréquence d'une distale forte est plus élevée chez ceux-ci d'une manière absolue, il n'en est plus de même lorsqu'on fait la distinction des tailles. En effet, chez les Crabes ♂ indemnes et sacculinés de plus de 25 mm, la fraction distale forte est presque constante, alors qu'elle s'atténue beaucoup chez les animaux plus petits. On peut, en conséquence, supposer que, tant que la Sacculine est interne, elle agit de façon très sensible sur la richesse en protéines des hôtes de petites tailles, alors qu'elle affecte à un moindre degré celle des Crabes plus grands et plus résistants.

Ajoutons encore que le fait que, chez tous ces sujets, dont certains étaient pourtant très féminisés, la fraction P caractéristique des femelles n'ait jamais été rencontrée, peut être considéré comme un nouvel argument contre l'hypothèse de SMITH.

— *A Sacculine externe*. — Ce groupe se compose de 35 animaux, la taille des hôtes variant de 15 à 38 mm et celle des parasites de 1 à 11 mm.

Deux de ces Crabes sont en C₃, 7 au début de C₄, 25 en C₄. Pour l'un d'eux, le stade a été omis. La majeure partie des stades C₄-début se trouvent chez les petits animaux. Ils sont moins fréquents que chez les mâles à parasite interne et correspondent tous à des hôtes dont les Sacculines sont encore fort petites, donc probablement sorties à la dernière mue.

Les figures électrophorétiques se dénombrent comme suit : 22 DF, 7 DM, 6 Df. Dans deux cas seulement, on peut noter une fraction I moyenne ou faible. Un seul individu s'est trouvé porteur de PM.

Comparées à celles des mâles à Sacculine interne, ces fréquences ne révèlent aucune différence caractéristique. Il ne semble donc pas que l'édification du sac viscéral perturbe d'une manière brutale, du moins au début, le métabolisme protéique de l'hôte. Son action semble se restreindre à une atténuation de la fraction distale et à la raréfaction des protéines du groupe intermédiaire. Ici encore, on ne voit pas apparaître, à une exception près, la fraction P propre aux femelles.

— *A Sacculine externe tombée*. — Nous avons analysé l'hémolymphe de 6 mâles de 17 à 40 mm dont les Sacculines externes disparues avaient laissé des cicatrices mélanisées.

Tous ces Crabes étaient en C₄ et leur féminisation assez poussée. Cinq sérums comportaient une distale forte. Les fractions I et P étaient absentes.

Les électrophorégrammes de ces animaux ne se distinguent donc pas de ceux des deux catégories précédentes et ils n'apportent pas d'éléments nouveaux.

Si l'on essaie de dégager quelques conclusions générales relatives à l'ensemble des Crabes ♂ sacculinés, on peut retenir que, du point de vue électrophorétique, la fraction distale reste forte chez les individus de grande taille, mais a tendance à devenir plus faible chez ceux qui mesurent moins de 25 mm. Cette observation peut être interprétée en admettant que les premiers ont mieux résisté à l'agression parasitaire ou ont eu le temps de s'en relever, alors que les seconds, plus fragiles, ont été plus atteints. Les fractions I et P n'ont été que très rarement retrouvées chez les Crabes de ces échantillons, mais elles n'étaient pas plus fréquentes dans les lots d'animaux indemnes de la même époque et de la même origine.

Parallèlement aux mâles, examinons à présent les femelles.

b) *Etude des femelles.*

— *Femelles normales.*

27 femelles de 17 à 35 mm et ne présentant aucune racine parasitaire ont été analysées.

Dans le cycle d'intermue, un individu se situe en A, trois au début de C₄, vingt-et-un en C₄ et deux n'ont pas été classés.

Les animaux en A et en C₄-début sont parmi les plus petits. Tous ceux dont la taille est supérieure à 27 mm se trouvent, à cette époque de l'année, en C₄.

Parmi les 24 Crabes dont l'état des ovaires a été noté, 16 présentent des gonades blanches et sont en période de repos génital. Les huit autres portent des ovaires jaunes avec de petits ovules (cinq individus), ou oranges avec de gros ovules (trois individus). Ces derniers sont donc dans un état de vitellogenèse avancée ; tous ont une taille supérieure à 28 mm.

Les figures électrophorétiques se caractérisent comme suit : la fraction D est faible dans six cas qui sont, en général, voisins de la dernière mue ; elle est une fois d'importance moyenne et vingt et une fois très colorée. Une fraction I moyenne n'est retrouvée que dans deux cas. Le groupe P est moyen deux fois et faible quatre fois. Il ne manifeste aucune corrélation évidente avec la vitellogenèse car, si souvent il correspond à des ovaires jaunes ou oranges, on le trouve aussi quelquefois chez des animaux dont les gonades sont blanches. De plus, certains Crabes indiscutablement en vitellogenèse ne présentent pas ce groupe proximal.

On peut donc conclure qu'au mois d'août, la majeure partie des Crabes ♀ indemnes de l'Etang de Thau, de 17 à 35 mm, se trouvent au stade C₄ de leur cycle d'intermue et qu'à l'électrophorèse leurs sérums manifestent une fraction distale importante et, dans quelques cas, une fraction proximale plus ou moins intense, mais sans relations nettes avec la vitellogenèse. Néanmoins, si l'on compare le présent échantillon à celui des femel-

les indemnes analysées à Roscoff à pareille époque de l'année, on ne manque pas de relever que chez les Crabes de la Manche la fraction P est beaucoup plus fréquente qu'à Sète.

— *Femelles sacculinées.*

— *A Sacculine interne.* — Les essais sont faits sur sept femelles de 17 à 34 mm dont trois sont encore proches de leur dernière exuviation et trois autres en C₄. Le stade du dernier individu n'a pas été noté.

Tous les ovaires sont blancs et en repos génital, état obligatoire pour les animaux les plus petits qui sont encore impubères, état normal pour les autres si l'on considère la saison.

Quatre figures électrophorétiques présentent des distales fortes et trois des distales faibles. Aux étapes A₂, B, C₃, correspondent des teneurs minimales en protéines. Comme les autres Crabes présentent une fraction distale forte malgré la présence de racines de Sacculine, on peut en conclure que celles-ci ne perturbent que peu le métabolisme protéique.

— *A Sacculine externe.* — Nous avons disposé de douze femelles d'une taille allant de 11 à 33 mm. Toutes sont en C₄ à l'exception d'un seul animal qui est en C₃.

Les ovaires sont blancs et au repos, ce qui est normal dans certains cas pour la taille et dans tous, si l'on considère la saison.

Les sacs viscéraux des parasites mesurent de 2 à 11 mm.

Parmi les électrophorogrammes, on note huit distales fortes, deux moyennes et deux faibles. A l'une des fractions distales fortes est associée une intermédiaire faible.

La fréquence des distales fortes montre une fois de plus que la Sacculine, même externe, n'entame au début que très faiblement le taux protéique de son hôte.

— *A Sacculine externe tombée.* — Seuls deux de ces animaux ont pu être étudiés. Leurs tailles sont respectivement 22 et 26 mm. Le premier, qui est en C₃, n'a qu'une distale faible, alors que le second, en C₄, présente cette fraction avec une intensité normale. Ces résultats, trop peu nombreux pour justifier une conclusion, ne s'opposent pas en tout cas à ceux des essais précédents.

c) *Conclusions.*

A première vue, les résultats fournis par l'étude des Crabes ♀ parasités de l'Etang de Thau font penser que ces animaux ne sont qu'assez peu touchés dans leur métabolisme protéique par le parasitisme de la Sacculine. Leur comparaison avec les femelles indemnes et contemporaines du même biotope ne révèle en effet qu'une diminution faible ou inconstante de la fraction distale. Ce parallèle n'a, en réalité, que peu de valeur, car il est fait à une époque où, de façon saisonnière sur le littoral méditerranéen, les Crabes ♀ sont dans un état de relatif repos physiologique, la vitellogenèse ne débutant que plus tard. En cette saison, même l'hémolymphe des animaux indemnes ne renferme que rarement les fractions I et P. Il est donc difficile de dire, d'après de tels échantillons, si la Sacculine est apte à empêcher l'apparition de ces fractions ou à les faire disparaître et, sous cet angle, les animaux de Roscoff sont plus probants.

Ces réflexions nous ont amené à consacrer une étude spéciale à un échantillon de Crabes ♀ de l'Etang de Thau prélevé en hiver, donc en pleine période de vitellogenèse.

5. *Variations électrophorétiques des protéines du sérum d'un échantillon hivernal ♀ de la population de Carcinus maenas de l'Etang de Thau.*

On sait que dans l'Etang de Thau la ponte des Crabes débute vers la mi-novembre, présente un maximum en décembre et janvier pour devenir exceptionnelle en mars. En nous rendant à Sète au mois de janvier, nous avons les meilleures chances de trouver un grand nombre de femelles en train d'élaborer leurs ovules ou de les pondre. C'est ce que nous avons fait du 4 au 13 janvier 1956.

Un total de 102 électrophorèses sur papier a été réalisé pendant cette période suivant les normes habituelles.

Nous considérerons d'abord les analyses faites sur des femelles en vitellogenèse, puis celles qui concernent les animaux portant une ponte.

a) *Femelles en vitellogenèse.*

Ont été étudiées 71 femelles mesurant de 27 à 39 mm. La dissection révèle que l'hépatopancréas de ces animaux est toujours jaune pâle avec une quantité variable d'inclusions brunes.

L'observation macroscopique des ovaires montre que ceux-ci sont tous colorés d'une teinte orange plus ou moins vive et comportent de gros ovules chargés de vitellus. Dans huit cas néanmoins, ces ovaires présentent des anomalies dont six sont dues au parasitisme par la Sacculine. Ils fournissent quelques exemples de l'action que peut avoir ce Rhizocéphale sur les gonades ♀ de son hôte. En général, celles-ci sont très réduites - et cette atrophie ne laisse quelquefois subsister qu'un tractus blanc sans ovules visibles, bien que l'hôte soit de grande taille ou la Sacculine encore peu développée. Dans d'autres cas, les ovaires ont subi un début de vitellogenèse, les ovules atteignent une taille moyenne et sont jaune pâle ou légèrement oranges. D'autres fois encore, ils restent blancs et prennent un aspect granuleux, sclérosé. Parfois aussi, certains ovules seulement sont jaunes et disséminés dans la masse des autres qui ne se colorent pas. Toutes les observations concordent pour montrer que l'action du parasite est des plus énergiques et inhibe de manière radicale les fonctions reproductives ♀.

Dans les 63 autres cas, les ovaires sont en pleine vitellogenèse avec de gros ovules orange vif.

Les électrophorèses des huit cas anormaux dont les sérums sont toujours orange vif révèlent une distale forte et une proximale très abondante.

Celles des 63 femelles normales en vitellogenèse manifestent la présence d'une fraction distale forte quelquefois accompagnée d'une fraction proximale faible ou moyenne, surtout lorsque l'hémolymph est jaune ou verdâtre. Ici encore, le groupe proximal ne paraît pas lié de façon constante et immuable à la vitellogenèse. Il apparaît chez certains animaux ; il est absent chez d'autres. Peut-être est-il le reflet d'une teneur actuelle de l'hémolymph en protéines de réserve, cette teneur pouvant varier d'une part en fonction de l'importance de la production par les organes générateurs, d'autre part suivant la rapidité ou la régularité de la consommation par les organes utilisateurs.

Signalons aussi que la fraction I n'est décelable chez aucune de ces femelles et qu'en cela cet échantillon diffère nettement de celui de Roscoff où cette fraction ne fait pas défaut. Pour le reste, les deux séries expérimentales concordent parfaitement.

b) *Femelles ovigères.*

Vingt-quatre femelles de 25 à 41 mm portent sous l'abdomen une volumineuse ponte orange. Leur hépato-pancréas est toujours blanc ou d'un jaune très pâle. Les ovaires sont naturellement blancs et sans ovules. Dans quelques cas seulement, il reste de rares ovules oranges non pondus, d'aspect déliquescents.

Les électrophorèses montrent dans tous les cas l'existence d'une distale forte. Celle-ci semble pourtant un peu moins intense que celle des femelles en vitellogenèse. Dans 14 cas, on trouve une fraction proximale d'intensité variable, mais ne dépassant jamais la moyenne. Le groupe protéinique intermédiaire n'a jamais été rencontré.

La comparaison de ces données avec celles des femelles en vitellogenèse autorise à dire que la ponte elle-même n'a pas de retentissement profond et rapide sur l'électrophorégramme du sérum des femelles. Seule existe l'indication d'une diminution de la fraction distale. Cette constatation n'exclut d'ailleurs pas la possibilité de changements plus marqués durant les mois qui suivent, à un moment où les femelles œuvées libèrent leurs embryons et reconstituent leurs réserves métaboliques au niveau de l'hépatopancréas.

c) *Conclusions.*

Si, de cet ensemble un peu complexe de données relatives aux Crabes de l'Etang de Thau on essaie de dégager quelques conclusions générales, on peut retenir que :

Les mâles indemnes du mois d'août sont en C₄ et présentent uniquement une fraction distale forte. Leurs homologues porteurs d'une Sacculine interne ou externe ne subissent qu'une faible diminution de cette fraction, diminution qui est plus sensible chez les individus petits et moins résistants. A cette époque, chez tous ces animaux, on ne trouve pratiquement jamais les fractions I et P.

Les femelles indemnes de la même saison, elles aussi en C₄, ne diffèrent des mâles que par quelques apparitions isolées de la fraction P sans que se manifeste un lien évident entre ces protéines et un début de vitellogenèse. Au mois de janvier par contre, lorsque les Crabes ♀ ont des ovaires presque mûrs, les fractions P sont plus fréquentes. Mais là encore, la relation avec la maturation des ovules reste obscure. Le processus de la ponte lui-même n'amène que peu de variations dans le protéinogramme des femelles qui portent encore leurs œufs. Comme chez les mâles, la Sacculine interne ou externe ne provoque qu'une légère diminution de la fraction distale de l'hémolymphe des hôtes.

Existe-t-il des différences biochimiques raciales entre les Crabes de la Manche et ceux de la Méditerranée ? Les analyses que nous venons de décrire n'en mettent pas en évidence en ce qui concerne les protéines. Chez les animaux des deux biotopes, on rencontre les trois fractions D, I, P et aucune fraction spéciale ne les différencie. Lorsque des dissemblances se manifestent dans les protéinogrammes de lots homologues prélevés à la même époque, elles ne sont pas dues à des différences constitutives des animaux, mais sans doute, pour des raisons climatologiques, à une autre répartition annuelle de leurs principales fonctions physiologiques.

Ceci n'exclut cependant pas que de telles particularités biochimiques puissent exister et distinguer les deux populations. Elles ne sont alors perceptibles qu'à une autre échelle ou concernent peut-être d'autres substances.

6. *Variations électrophorétiques saisonnières des protéines du sérum de Carcinus maenas de Roscoff.*

La confrontation des résultats d'analyses de certains des échantillons étudiés jusqu'à présent révèle quelques discordances qui font pressentir l'existence de variations de la composition en protéines de l'hémolymphe suivant l'époque de l'année à laquelle les animaux sont récoltés.

Le seul moyen de s'assurer de la réalité de ce fait consiste à répéter à intervalles réguliers pendant au moins un an, un nombre suffisant d'électrophorèses pour que les résultats soient représentatifs de la population et donnent une image approchée de sa protéinémie pendant ce laps de temps.

C'est ce travail qui a été poursuivi de mars 1957 à mars 1958 inclus.

a) *Méthodologie.*

Pendant une année entière, une soixantaine de Crabes ♂ et ♀ fraîchement pêchés nous ont été régulièrement expédiés le 10 de chaque mois par la Station biologique de Roscoff. Seuls les mois de juillet et août ont fait exception. Pour combler la lacune d'août, nous avons utilisé les données recueillies le même mois, en 1954, à Roscoff, à partir d'échantillons ♂ et ♀ normaux. En définitive, seul le mois de juillet reste donc inexploré.

Compte tenu d'une faible mortalité due au transport, les expériences ont porté sur 711 Crabes dont 366 mâles et 345 femelles.

Pour la majeure partie des échantillons, la taille moyenne des individus s'est située entre 25 et 30 mm. Deux exceptions sont toutefois à souligner : celles des mois d'août et de septembre où les Crabes analysés sont plus grands (environ 38 mm). Les essais concernent donc uniquement des animaux adultes et pubères.

Une fraction inférieure à 3 % de cet effectif porte une Sacculine externe ou interne, ou encore des exemplaires de *Portunion maenadis*. Il est donc permis de considérer, sans erreur grave, que l'ensemble de ces Crabes sont normaux.

Dès réception, ils ont été placés en eau de mer et régulièrement nourris. Puis, à raison de six ou douze par jour, des électrophorèses ont été faites pour la totalité des individus. En général, elles se sont étalées sur une douzaine de jours. Compte tenu de ce délai, on peut donc approximativement admettre qu'elles correspondent à des Crabes prélevés dans la période centrale de chaque mois.

Pour chaque animal après dissection et pour chaque électrophorèse ont été notées les caractéristiques habituelles. Une attention toute particulière a été portée à l'état des ovaires chez les femelles.

b) *Résultats.*

L'intérêt essentiel de cette étude réside dans l'observation de la présence ou de l'absence des fractions électrophorétiques I et P suivant le sexe des animaux et la période de l'année. Nous avons donc calculé le pourcentage de présences de ces fractions par rapport au nombre total des individus de chaque échantillon mensuel ♂ ou ♀. Le tableau XV ci-dessous rassemble les données numériques ainsi recueillies et les graphiques de la figure 17 (page 115) les concrétisent. Les différentes colonnes du tableau indiquent, de gauche à droite, pour chaque sexe : le mois, le nombre d'individus de l'échantillon mensuel, leur taille moyenne, la fréquence en % de la fraction I et celle de la fraction P. La colonne supplémentaire du groupe ♀ exprime le pourcentage des Crabes dont les ovaires manifestent, par la taille des ovules et leur couleur, une vitellogenèse évidente.

TABLEAU XV

*Fréquences mensuelles des fractions I et P
des sérums de Carcinus maenas de Roscoff
et des présences d'ovaires en vitellogenèse*

Mois	Mâles				Femelles				
	Nombre d'animaux	Taille (mm)	% I	% P	Nombre d'animaux	Taille (mm)	% I	% P	% Vitellogenèse
Mars	43	25	97,7	4,6	51	24	78,4	17,6	15,7
Avril	28	25	50,0	0,0	16	26	68,7	25,0	25,0
Mai	28	28	75,0	0,0	34	27	67,6	5,9	11,7
Juin	32	25	65,6	0,0	19	26	52,6	5,2	5,3
Juillet	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Août	40	40	40,0	12,5	38	40	52,6	47,3	57,9
Septembre	22	38	9,1	0,0	26	37	15,4	57,7	76,9
Octobre	24	27	8,3	0,0	26	29	30,7	76,9	73,1
Novembre	27	28	7,4	0,0	32	28	0,0	75,0	68,8
Décembre	30	26	21,8	0,0	26	27	0,0	57,7	65,4
Janvier	26	26	69,2	0,0	32	27	37,5	78,1	53,1
Février	35	30	82,8	0,0	25	30	52,0	60,0	52,0
Mars	29	29	58,6	0,0	19	31	21,0	42,0	36,8

N.B. — *Août* : Les animaux de ce mois ont été récoltés en 1954 ; tous les autres datent de 1957 à 1958.

L'examen de toutes ces données montre que :

1° La fraction intermédiaire est très fréquente dans les premiers mois de l'année chez les Crabes ♂. Elle diminue progressivement par la suite pour devenir exceptionnelle en septembre, octobre et novembre. Le mois de décembre annonce sa réapparition.

2° Chez les femelles, la même fraction, subit des fluctuations analogues, mais un peu moins marquées et seuls les deux derniers mois de l'année accusent une disparition totale.

3° La fraction P n'existe qu'exceptionnellement chez les mâles.

4° La fraction P est très fréquente chez les femelles et s'y rencontre surtout d'août à mars, disparaissant presque totalement durant les autres mois.

5° La vitellogenèse se manifeste de juillet à mars, alors qu'en avril, mai et juin, on ne la rencontre plus que par exception.

Quelles remarques et interprétations suggèrent ces faits fondés, on le sait, sur un nombre d'animaux important ? On se souvient que les essais antérieurs nous avaient amené à penser que la fraction I pouvait être liée au métabolisme de la mue, bien que la corrélation entre ces deux termes restât assez imprécise. Au-delà des quelques anomalies dues aux hasards de l'échantillonnage, aux variations individuelles ou à la pathologie, l'expérimentation de longue durée qui vient d'être évoquée confirme l'existence de tels liens. Ceux-ci sont particulièrement nets chez les mâles où les protéines intermédiaires sont les plus fréquentes durant les mois d'exuviation ou de préparation à ce phénomène, c'est-à-dire de janvier à août. C'est dans cette période en effet que, dans les lots de Crabes reçus, on observe le plus fort pourcentage d'individus en D₁, D₂, D₃, D₄, étapes qui annoncent la mue, et en C₁, C₂, C₃ et C₄-début, étapes qui en indiquent l'accomplissement récent. Or, la plupart des animaux en D manifestent une fraction I souvent très importante. Par contre, l'exemple du mois d'octobre montre que chez 24 mâles examinés qui se trouvaient en C₄, cette même fraction ne se rencontre que deux fois. Il en est de même pour septembre et novembre. Nul doute donc que les protéines concrétisées par la tache intermédiaire ne soient impliquées dans les transformations métaboliques qui vont de pair avec la préparation d'une nouvelle carapace et de tissus agrandis.

Aucune raison ne permet de supposer qu'il en est autrement chez les femelles. Si, dans ce sexe, le caractère périodique de I est un peu moins net et légèrement décalé vers la fin de l'année, c'est que le phénomène de la mue y interfère avec celui de la vitellogenèse et de la ponte. Ces deux processus physiologiques ne peuvent, en effet, se produire simultanément ; il est bien improbable que l'organisme ♀ puisse à la fois mobiliser ses réserves pour l'élaboration d'un nouvel exosquelette et pour l'édification des ovocytes. Il est nécessaire qu'ils soient alternatifs, ce qui n'exclut d'ailleurs pas une superposition partielle des phases préparatoires ou terminales de l'un ou de l'autre, comme il apparaîtra par la suite.

Auparavant, insistons sur le fait que, contrairement à une opinion très répandue que nous avons déjà rapportée, il ne semble pas que la vitellogenèse des Crabes de la Manche ait une répartition saisonnière autre que celle des homologues méditerranéens. N. DEMEUSY (1958) a déjà attiré l'attention sur ce sujet. Les chiffres que nous avons obtenus sont tout aussi formels et la figure 17 (page 115) le montre de façon expressive. A Roscoff, le pourcentage des femelles à ovaires volumineux et colorés n'est important que d'août à mars inclus. Il est très faible en tout autre temps. Seule une généralisation un peu hâtive a pu faire penser que parce qu'on trouvait dans la Manche des Crabes ovigères en toutes saisons — ce qui est exact — ces animaux y pondaient indifféremment

toute l'année, contrairement à ce qui se passe en Méditerranée. En réalité, de telles vitellogenèses ne sont que des exceptions et il ne faut pas les considérer comme représentatives de l'état général de la population au moment considéré.

En ce qui concerne la ponte elle-même, phénomène beaucoup plus restreint dans le temps que la vitellogenèse, ce sont surtout les lots de novembre, décembre et janvier qui ont apporté le plus d'individus œuvés. C'est donc à cette époque que la ponte se produit le plus fréquemment. Sous cet angle aussi, les Crabes de Roscoff ne se distinguent guère de ceux de Sète et peut-être seulement par une délimitation moins nette des frontières de la période de reproduction.

Dans le domaine plus proprement électrophorétique, la comparaison du graphique de la fréquence des vitellogenèses avec celui de la fréquence de la fraction P frappe par l'analogie des deux tracés. Les protéines proximales sont surtout nombreuses pendant les mois à vitellogenèse; elles deviennent rares à l'époque où la majeure partie des ovaires sont blancs et réduits. Il est donc probable qu'elles jouent un rôle important dans l'édification du matériel ovulaire, ce qui est d'autant plus vraisemblable qu'elles paraissent caractéristiques des femelles. Si, très exceptionnellement, on les rencontre chez quelques mâles, il ne s'agit sans doute que de cas pathologiques, car, soulignons-le en cette occasion, les Invertébrés, eux aussi, peuvent être malades, fait que trop souvent les Biologistes semblent ignorer.

Ajoutons encore que, s'il est impossible que mue et ponte coïncident, il n'est pas exclu que ces deux phénomènes se superposent dans une partie de leurs phases préparatoires ou terminales. C'est en tout cas ce que paraît indiquer la coexistence assez fréquente des fractions I et P. Cette coexistence ne concerne qu'une partie de la période de vitellogenèse. En effet, le sommet de l'histogramme des fréquences de P et des vitellogenèses se situe approximativement au niveau de la dépression de celui des fréquences de I chez les femelles, ce qui signifie qu'à l'époque où les maturations ovariennes sont les plus nombreuses, les fractions intermédiaires sont les plus rares. En général, ce n'est que dans les périodes limites de cette zone que les deux sortes de protéines coexistent

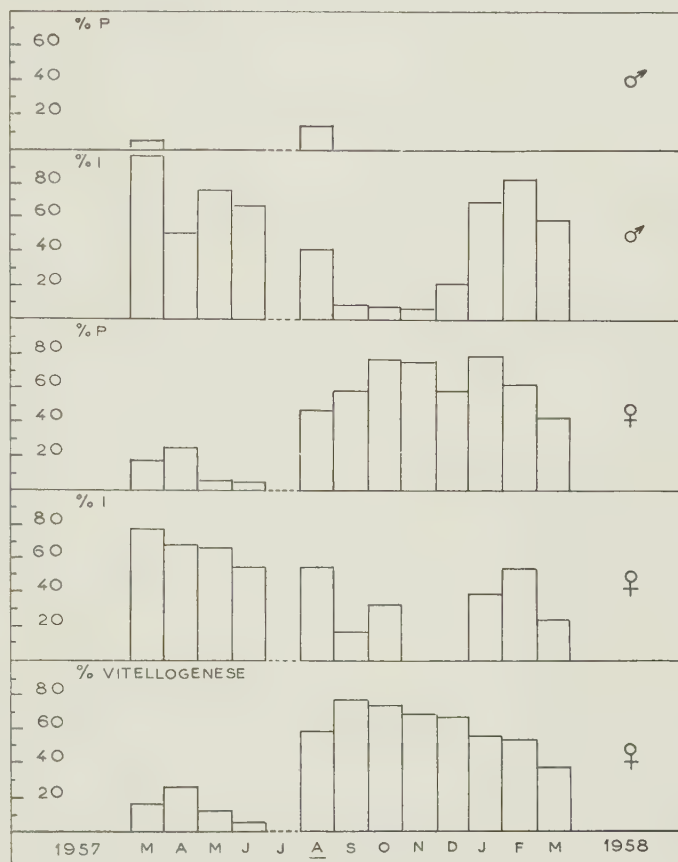


FIG. 17. — Histogrammes des fréquences mensuelles des différentes fractions électrophorétiques du sérum des Crabes de Roscoff et des présences d'ovaires en vitellogenèse chez les femelles.

avec la plus grande fréquence, surtout en janvier, février et mars. Il est fort possible que, vers la fin de la saison de vitellogenèse, nombre d'individus commencent déjà à élaborer leurs protéines I en prévision de la mue qui suivra la ponte. De même, au terme de la saison de préparation des mues, certaines femelles peuvent débiter l'accumulation des substances P pour la ponte hivernale.

En résumé, si l'on veut bien écarter les exceptions et anomalies inhérentes à tout matériel biologique, l'ensemble de ces faits complexes peut se schématiser comme suit :

La fraction P n'est décelable chez les Crabes ♂ que dans quelques cas rares et sans doute pathologiques. Elle est, par contre caractéristique des femelles en vitellogenèse et s'y rencontre très fréquemment à Roscoff, d'août à février inclus.

La fraction I, qui paraît liée à la mue par des liens encore inconnus, est commune aux deux sexes. Dans la Manche, elle caractérise la majeure partie des mâles pêchés de janvier à juin, époque à laquelle on rencontre le plus grand nombre d'individus dans la partie dynamique de leur cycle d'intermue. Les mois suivants, et plus particulièrement septembre, octobre et novembre, constituent, dans ce domaine, une période de repos où la plupart des mâles sont en C₄ et sans fraction I.

Chez les femelles, cette même fraction I n'apparaît que très peu en septembre et octobre, nullement en novembre et décembre et ces mois correspondent aux maxima de vitellogenèse. Elles deviennent plus fréquentes par la suite, lorsque ces Crabes, rétablis de la dépense physiologique importante de la ponte, refont des réserves pour faire face à la prochaine exuviation.

Voilà l'essentiel des résultats de cette étude systématique et prolongée. Peut-être s'étonnera-t-on qu'il n'y ait pas été question de la fraction distale ? Cela ne signifie nullement que celle-ci ait été négligée ou soit sans intérêt. En toute époque, elle est visible sur les bandes d'électrophorèse et même lorsque celles-ci ne sont que très peu colorées en raison du peu de protéines présentes, c'est toujours au niveau de la fraction la plus rapide que la coloration peut être distinguée. Son importance varie toutefois dans des proportions considérables. Très souvent, la tache qui la matérialise est d'un bleu intense ; dans d'autres cas, elle est plus faible, moins importante notamment que les taches de I ou de P. Pour tous les animaux étudiés, nous avons noté, de façon sommaire, ces variations en qualifiant les fractions de fortes, moyennes ou faibles. Si nous n'en faisons pas état, c'est que nous estimons cette évaluation d'une précision insuffisante. A notre sens, l'étude quantitative rigoureuse de ces variations exige une technique plus fidèle et précise que celle de l'électrophorèse sur papier. C'est à l'électrophorèse en gélose que nous réserverons, dans des travaux futurs, le soin de résoudre ce problème.

7. Nature des fractions protéiques isolées.

Jusqu'à présent, les fractions sériques apparues sur papier n'ont été caractérisées que par leurs positions par rapport à la ligne de dépôt et désignées par des initiales rappelant ces emplacements.

Répetons que cette nomenclature provisoire, qui peut paraître simpliste, est en fait beaucoup préférable à celle qui utilise, pour des fractions inconnues, la désignation par lettres grecques devenue classique pour le sérum humain. Ce dernier procédé, judicieux et utile pour situer immédiatement les protéines nouvelles dans l'échelle des

mobilités par rapport à un système de référence bien connu, a le tort de suggérer involontairement une parenté chimique probablement inexistante et en tous cas non démontrée, entre des substances d'origines différentes. Par exemple, ce n'est pas parce que la fraction intermédiaire se situe à la hauteur de l'albumine humaine qu'elle doit être considérée comme étant de nature albuminique.

La nature des trois fractions protéiques isolées était inconnue. Divers essais ont permis de la préciser dans une certaine mesure.

a) *Hémocyanine.*

Pour la fraction D, statistiquement la plus fréquente, une observation très sommaire a indiqué qu'elle devait comporter l'hémocyanine. En effet, les sérums très bleus se caractérisent toujours, après électrophorèse, par une coloration distale très intense, alors que ceux qui sont presque incolores correspondent toujours à des bandes où cette tache est très faible. Ce point de vue a été pleinement confirmé par E. ZUCKERKANDL (1958) chez *Maia squinado*, par détection du cuivre hémocyanique. Cet auteur pulvérise à la surface des bandes de papier filtre une solution acétonique de diéthylthiocarbamate qui fait apparaître en position distale des spots jaune-pâle caractéristiques du cuivre. Ces observations concordent encore avec les résultats de l'électrophorèse libre où l'hémocyanine s'est toujours révélée comme la fraction la plus rapide.

Pour obtenir des renseignements sur l'identité des autres protéines de l'hémolymphe, nous avons utilisé deux des méthodes de coloration spécifique courantes en sérologie humaine : celle des glycoprotéides et celle des lipoprotéines.

b) *Glycoprotéides.*

On sait que les glycoprotéides, encore appelés mucoprotéides, sont des hétéroprotéides dont le groupement prosthétique est de nature polysidique. Après électrophorèse, ils peuvent être mis en évidence par la méthode de KOW et GRONWALL qui a été décrite plus haut. Son application aux bandes portant le sérum de Crabe a provoqué une vive coloration rouge au niveau des fractions intermédiaires et proximales (fig. 18, page 118), alors que la fraction distale ne prend le colorant que de façon imperceptible.

Quelles conclusions tirer de ces faits ?

Dans les conditions de notre expérimentation, la méthode employée est spécifique, car l'électrophorèse et les divers lavages aqueux et alcooliques éliminent les substances susceptibles d'interférer de manière trompeuse dans la réaction : hexoses libres, lipides complexes, glycogène, sérine, thréonine, etc. Il est donc très probable que les deux fractions intéressées contiennent de fortes proportions de glycoprotéides. A l'heure actuelle, c'est tout ce que nous en savons. L'identité précise de ces substances fait encore défaut et rien ne permet, jusqu'à présent, de les ranger dans l'une ou l'autre des grandes catégories de la classification de Meyer : mucopolysaccharides, mucoprotéines, mucoïdes ou glycoprotéines. Quoi qu'il en soit, il est, hors de doute que l'approfondissement de cette question apportera des résultats d'une importance capitale. Pour s'en persuader, il suffit de se souvenir que, parmi ces hétéroprotéides porteurs de polysides, on compte des composés biologiquement très importants comme les hormones anté-hypophysaires, les antigènes spécifiques des groupes sanguins A, B, O, l'ovalbumine, la chitine. Le rôle

considérable que joue cette dernière dans le métabolisme des Arthropodes en général et des Crustacés en particulier ne manquera pas de nous rappeler les liens que nous avons trouvés entre la fraction intermédiaire et les étapes pré-ecdysiales du cycle d'intermue. Il n'est nullement exclu qu'une partie des glycoprotéides de cette fraction soit formée par un ou plusieurs métabolites de la chitine, temporairement véhiculés par le milieu intérieur, ou encore qu'elle comporte des substances à activité hormonale. On peut de même supposer que la fraction P renferme des matériaux protéiques indispensables à l'édification des réserves ovulaires. De telles éventualités ne peuvent qu'encourager de nouvelles recherches dans cette direction.

c) *Lipoprotéines.*

L'hémolymphe de Crabe renferme-t-elle des lipoprotéines ? L'emploi de la technique de SWAN a permis de répondre par l'affirmative à cette question. Le noir cérol B et le noir Soudan colorent fortement la fraction P (fig. 18, ci-dessous), alors qu'ils ne laissent que des traces infimes au niveau de D et de I. C'est donc dans la fraction P que se trouvent les lipoprotéines.

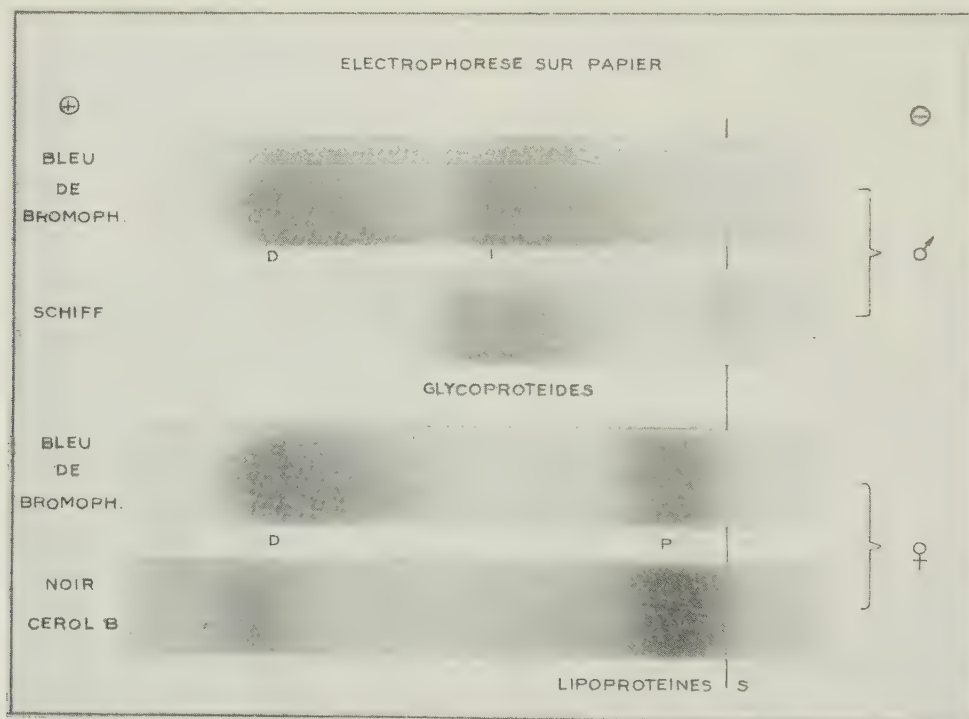


FIG. 18. — Coloration des glycoprotéides et des lipoprotéines du sérum de Crabes après électrophorèse sur papier.

Ce terme désigne, on le sait, des associations permanentes de molécules lipidiques et protéiques, associations qui sont seules capables d'expliquer la « dissolution » des graisses dans une phase aqueuse et leur masquage vis-à-vis des réactifs habituels.

Le fait de rencontrer de tels complexes dans le sérum de *Carcinus maenas* est une confirmation éclatante d'une anticipation de G. SMITH que nous avons signalée en son temps. On se souvient que cet auteur, surpris de constater que les lipides de l'hémolymphe n'étaient accessibles à leurs colorants spécifiques qu'après dénaturation brutale, avait émis l'idée de leur liaison temporaire avec des protéines pour transiter entre l'hépatopancréas et les ovaires. A présent que nous savons que ces complexes existent réellement, qu'ils font partie de la fraction électrophorétique P, que celle-ci correspond, en général, aux animaux en vitellogenèse, un tel mécanisme reçoit des fondements sérieux et il n'y a plus guère de raisons de douter qu'il ne représente la voie empruntée par les substances vitellines pour leur accumulation dans les ovocytes en maturation.

La nature exacte des parties protéiques et lipidiques de ces cénapses reste à déterminer. On peut s'interroger aussi sur la signification de la réaction doublement positive de P avec les réactifs des glycoprotéides et des lipoprotéines. Ces deux groupes de substances coexistent-ils dans la fraction ? S'agit-il d'un lipide complexe inconnu qui n'aurait pas été éliminé par les lavages ? Est-on en présence d'une association ternaire lipide-protéine-polyoside ? La question reste posée.

Quant aux traces de colorant fixées en D et I, il est probable qu'elles sont dues à des impuretés lipoprotéiques entraînées par l'hémocyanine et le groupe intermédiaire. Ce phénomène est en effet bien connu en sérologie humaine.

d) *Conclusions.*

En résumé, les essais qui viennent d'être relatés ont permis de ranger les trois fractions électrophorétiques du sérum de *Carcinus maenas* en trois grandes catégories du groupe des protéides.

La fraction distale renferme un chromoprotéide cuivrique : l'hémocyanine. Ses propriétés et son rôle sont relativement bien connus.

La fraction intermédiaire, et peut-être la fraction proximale, comportent des glycoprotéides de nature inconnue dont les fonctions, bien qu'encore non élucidées, peuvent déjà en partie être supposées.

La fraction proximale seule contient des lipoprotéines chimiquement non identifiées dont les rapports avec la vitellogenèse paraissent certains.

Bien qu'encore très partiels, ces premiers résultats augurent de recherches nouvelles qui permettront peut-être d'éclairer le mécanisme d'édification de l'exosquelette et des œufs des Crustacés.

III. — ELECTROPHORESE EN GELOSE

Aux renseignements fournis par l'électrophorèse sur papier qui vient d'être décrite, nous avons voulu en ajouter d'autres en utilisant l'électrophorèse en gélose.

A. — Principe et avantages.

Cette technique, dont une première utilisation a été faite par A.H. GORDON et Coll. (1949), consiste à remplacer la bande de papier filtre de l'électrophorèse sur papier par un gel de gélose tamponnée dans lequel s'effectue la migration des substances à séparer.

L'emploi d'une gélose tamponnée comme support d'électrophorèse présente des avantages certains.

Du fait que, dans le gel, la part du substrat solide (1 à 1,5 %) est minime par rapport à la quantité de liquide (98 à 98,5 %), les conditions de l'électrophorèse se rapprochent beaucoup de celles de l'électrophorèse libre, sans en avoir les inconvénients. Le danger d'une adsorption des protéines par le substrat, telle qu'elle est courante avec le papier filtre, se trouve très diminué avec la gélose. Les fractions sont alors beaucoup mieux délimitées et ne manifestent plus d'effet de trainée.

La gélose purifiée constitue aussi un milieu très transparent qui se prête fort bien à la photométrie et à des évaluations quantitatives. Elle est de même un support favorable à certaines réactions enzymatiques et permet donc la localisation de telles activités dans les fractions séparées.

Reconnaissons toutefois que ces avantages indiscutables sont un peu atténués par des exigences opératoires plus sévères. Aussi, dans un but de simplification, nous avons mis au point une cuve à électrophorèse dans laquelle l'emploi de la gélose devient aisé. Cette cuve présente en outre le grand avantage d'être à usages multiples et de permettre sans difficultés l'emploi des techniques suivantes :

- Electrophorèse sur papier ;
- Electrophorèse en gélose ;
- Immunoélectrophorèse ;
- Micro-immunoélectrophorèse ;
- Electrophorèse en bloc d'amidon ;
- Electrophorèse en gel d'amidon ;

Elle semble particulièrement adaptée à des travaux de Naturalistes qui y trouveront la possibilité de faire d'intéressantes recherches comparatives dans une partie du Règne animal encore peu explorée sous ce rapport.

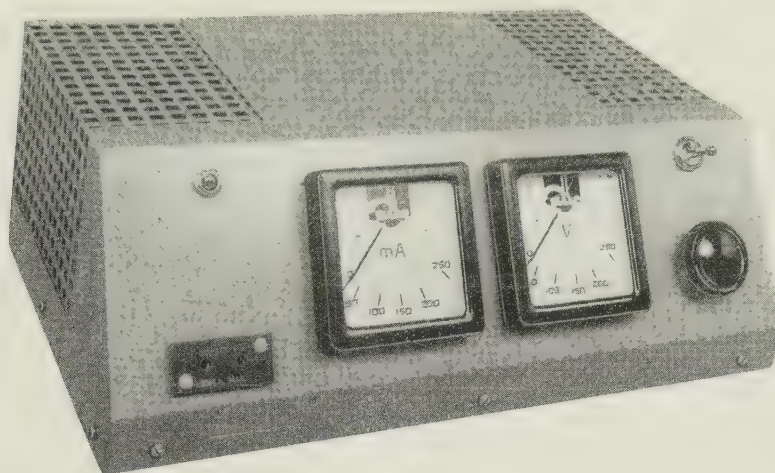
Décrivons donc cet appareil en détail, en expliquant son fonctionnement pour chaque méthode.

B. — Mise au point d'une cuve à électrophorèse à usages multiples.

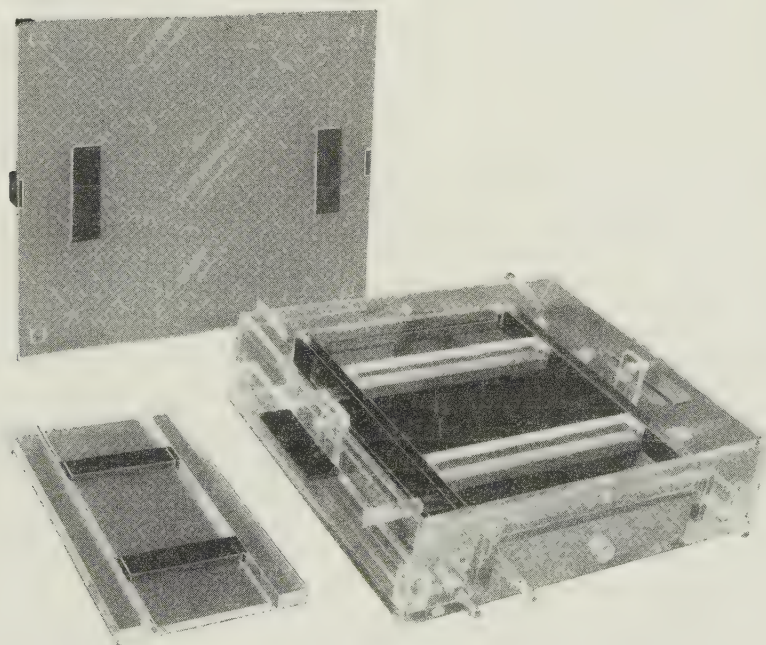
1. Description.

De forme rectangulaire, la cuve est construite (1) en plexiglas transparent M 70 ou M 222, variétés de ce matériau qui ne se déforment qu'à des températures supérieures à 100° C. Ses différentes parties sont assemblées à la colle « Colloplex », sous pression, après un ajustage très rigoureux.

(1) Construite et diffusée par les Etablissements Chaix, 6, Avenue Milton, Nancy.



Le bloc d'alimentation



La cuve à électrophorèse

FIG. 19. — Appareil à électrophorèse à usages multiples

Le format intérieur est $300 \times 260 \times 70$ mm.

Une vue d'ensemble de la cuve et de ses accessoires est donnée par la figure 19 (page 121).

Une coupe longitudinale est représentée par la figure 20 ci-dessous.

Un plateau central et horizontal de 260×180 mm, en plexiglas noir — couleur qui facilite les observations sur les gels — sert de table d'électrophorèse (L). Il subdivise la cuve en deux bacs latéraux (F) pour le tampon (N) et un compartiment central (J) qui permet un refroidissement par circulation d'eau ou de saumure (I = arrivée ; K = vidange).

Sur les montants de la table sont collées deux règles (Z) dont le rôle apparaîtra par la suite.

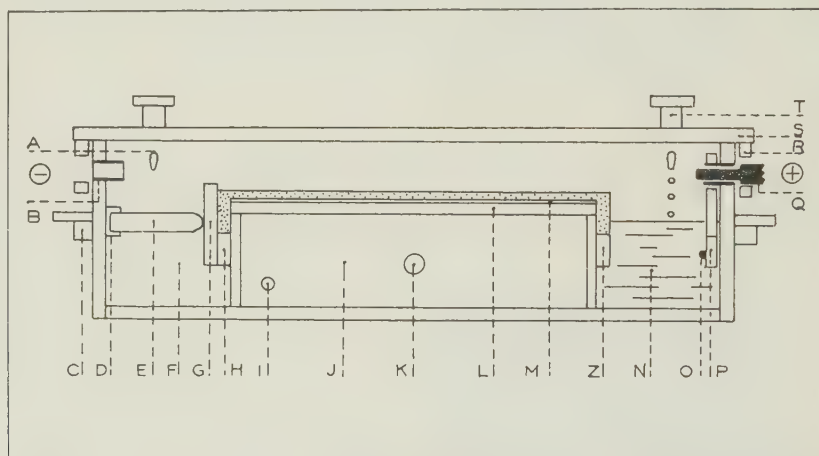


FIG. 20. — Coupe transversale de la cuve à électrophorèse à usages multiples.
Légende dans le texte.

Comme dans le dispositif original de P. GRABAR et C. A. WILLIAMS (1955), pour éviter des variations trop importantes du pH pendant l'électrophorèse, le tampon est renouvelé goutte à goutte dans les bacs latéraux par un système de becs d'arrivée (A) et de tubes de trop-plein, ces derniers n'étant pas visibles sur la figure. L'alimentation en tampon est assurée par un réservoir de 5 à 10 l, surélevé par rapport à la cuve, et dont le débit peut se régler par robinets ou pincettes à vis. Le trop-plein s'écoule dans un récipient de recueil placé au-dessous du niveau de la cuve. Une rotation partielle des tubes de trop-plein à l'intérieur de leur joint en caoutchouc permet un réglage du niveau du tampon ; une rotation de 180° en assure la vidange automatique.

Les électrodes, formées par un conducteur en platine (O) fixé sur une règle en plexiglas (P), sont amovibles et s'adaptent par pression sur les fiches de connexion (B) qui traversent les parois latérales de la cuve.

Le couvercle (S) réalise une enceinte close et ses bords rabattus et perforés (R) sont traversés par les fiches de connexion de l'alimentation électrique. Ce système constitue un

verrouillage de sécurité simple qui empêche toute ouverture non intentionnelle de la cuve sous tension, sans pour cela exclure les observations et mesures sur les bandes et plaques d'électrophorèse durant les expériences.

Cuve et couvercle portent des poignées (C, T) qui en facilitent la manipulation. Grâce aux surfaces planes et aux propriétés du plexiglas, le nettoyage de l'ensemble est des plus aisés.

Divers accessoires de conception et d'adaptation très simples permettent l'emploi de chacune des méthodes citées.

Ainsi, un cadre rectangulaire de 260×210 mm, muni de deux poignées et de quatre pieds et dont les montants longitudinaux portent chacun une fente de 1 mm, sert à tendre les bandes pour l'électrophorèse sur papier. Il se pose librement sur les deux règles extrêmes de la table d'électrophorèse.

Deux plaques en plexiglas transparent de $260 \times 40 \times 6$ mm, dites plaques d'arrêt latérales, peuvent s'appliquer contre les règles Z et former ainsi, avec les montants du plateau central, deux tranchées destinées à recevoir une partie des gels au moment de la coulée. Ces plaques portent quatre taquets placés de telle sorte que, lorsqu'on utilise la face qui leur donne la position la plus basse, les tranchées se trouvent fermées entièrement à leur partie inférieure. Si, par contre, on utilise la deuxième face qui donne une position haute, il subsiste à la base des tranchées une fente dont le rôle sera indiqué par la suite. Six cales cylindriques en rondin-plexiglas de 10 mm sont pourvues à une extrémité d'un embout de caoutchouc. Elles servent à maintenir en place les plaques d'arrêt.

Une plaque dite de surélévation de $240 \times 76 \times 6$ mm peut se placer en position médio-longitudinale sur la table d'électrophorèse et sert pour la microméthode. Elle est alors complétée par deux règles d'arrêt qui forment avec elle deux tranchées réduites pouvant recevoir les gels.

Deux ponts mobiles de grande taille délimitent, lorsqu'ils sont posés sur la table d'électrophorèse et dans les tranchées latérales, des moules dont la largeur peut être réglée à volonté.

Deux ponts mobiles de petite taille remplissent un rôle semblable lorsqu'ils sont adaptés à la plaque de surélévation et à ses règles d'arrêt.

Le courant est fourni par un bloc d'alimentation (fig. 19, page 121) qui transforme un courant alternatif de 50 p. p. s. (110 ou 220 V) en courant redressé et stabilisé, réglable de façon continue de 50 à 220 V. Le débit de cette source est extrêmement stable jusqu'à 170 mA. Un milliampèremètre de contrôle permet de mesurer cette intensité, alors qu'un voltmètre indique la tension existant aux bornes de la cuve.

2. *Fonctionnement.*

a) *Montage général.*

L'ensemble du dispositif prêt à fonctionner comporte :

- la cuve à électrophorèse proprement dite et ses accessoires ;
- l'alimentation en tampon ;
- le bloc d'alimentation en courant continu.

La cuve est construite de sorte que, lorsqu'elle repose sur un plan horizontal, son plateau central soit parfaitement parallèle à celui-ci. Elle peut donc être installée sur une table ou une pailleasse remplissant cette condition. Lorsqu'un tel plan fait défaut, on peut le créer à l'aide d'une glace épaisse munie de trois pieds à vis réglables. La vérification de l'horizontalité de l'ensemble du dispositif se fait aisément avec un niveau à eau circulaire.

L'alimentation en tampon peut se faire à partir d'un tonnelet à eau distillée de 5 ou 10 l ou à l'aide de tout autre récipient comportant une tubulure inférieure. Sur celle-ci on adapte, par un bouchon de caoutchouc, un Y en verre dont les branches symétriques portent chacune un robinet à une voie qui se prolonge par un conduit en caoutchouc ou en polyéthylène qui rejoint le bec d'arrivée du bac à tampon de la cuve. Une fois le débit réglé au goutte à goutte, il est bon de le contrôler à plusieurs reprises, les obstructions étant fréquentes. Il est de même recommandé de filtrer le tampon de temps à autre pour limiter de tels incidents. A la sortie de la cuve, le tampon collecté par les tubes de trop-plein est amené par deux conduits à un flacon récepteur de capacité au moins égale à celle de la réserve utilisée. Les extrémités inférieures de ces conduits ne doivent à aucun moment plonger dans le tampon sous peine d'un circuit électrique secondaire. La réalisation du flux continu de tampon n'est indispensable que pour les électrophorèses au cours desquelles l'intensité du courant pourrait produire une électrolyse considérable du tampon, donc une modification sensible du pH.

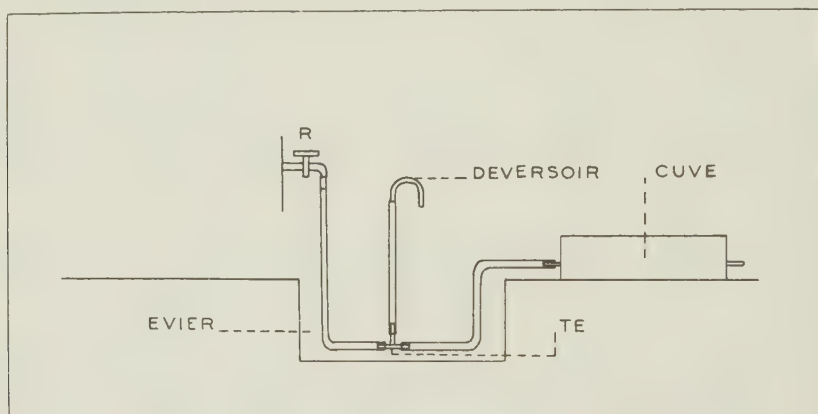


FIG. 21. — Schéma d'un dispositif de sécurité pour le circuit de refroidissement de la cuve à électrophorèse à usages multiples.

Le refroidissement du support et de l'enceinte d'électrophorèse peut être obtenu par circulation d'eau ou de tout autre liquide réfrigérant dans le compartiment central de la cuve. Dans le cas de l'eau, il suffit de brancher la tubulure d'entrée sur une canalisation d'eau froide et de régler un débit modéré. Pour éviter toute surpression qui pourrait être fatale à la cuve et obtenir en même temps un dégazage partiel de l'eau, il est recommandé d'intercaler dans le circuit d'arrivée le dispositif de sécurité représenté par la figure 21 ci-dessus. Pendant le remplissage initial de la cuve, il est nécessaire de maintenir celle-ci dans une inclinaison favorable à l'élimination de l'air résiduel.

D'une manière générale, deux prescriptions très importantes doivent toujours être respectées lors de l'utilisation de la cuve :

- 1° Sous peine de déformation importante, ne jamais couler directement un gel chaud sur le plexiglas de la table d'électrophorèse. Toujours recouvrir celle-ci d'une plaque de verre de format approprié ;
- 2° Eviter toute surpression dans le compartiment de refroidissement.

L'emploi du bloc d'alimentation est simple et ne demande aucune précaution particulière.

b) *Electrophorèse sur papier.*

Le principe reste le même que dans la plupart des autres cuves existantes.

Découper des bandes rectangulaires de papier à électrophorèse d'une longueur de 250 mm et de la largeur désirée. En introduire les extrémités dans les fentes du cadre porte-bandes et tendre le papier en faisant dépasser des longueurs égales de chaque côté. Réaliser des pliures nettes au niveau des fentes et veiller à l'horizontalité du papier.

Remplir ensuite les bacs latéraux de tampon jusqu'à affleurement du bord supérieur des règles Z. Mettre en place le cadre porte-bandes de façon à ce que les extrémités du papier plongent de chaque côté dans le tampon. Celui-ci progresse par capillarité dans le papier. Après fermeture de la cuve, attendre la fin de cette imbibition spontanée. Une fois qu'elle est terminée, retendre les bandes s'il y a lieu et déposer le mélange à analyser suivant le procédé habituel, en se servant de repères tracés au préalable. Refermer la cuve et lui appliquer la tension choisie.

Une fois la séparation jugée suffisante, sortir le cadre et les bandes et laisser sécher pendant une demi-heure à la température ambiante. Découper ensuite le papier filtre au ras des bords internes du cadre et terminer le séchage sur une plaque de verre à l'étuve à 80° C pendant vingt minutes.

On peut alors procéder à la coloration des fractions suivant les méthodes habituelles.

Pour de telles électrophorèses, il n'est pas nécessaire de réaliser un flux continu de tampon. Il suffit de changer celui-ci au bout de cinq ou six utilisations.

c) *Electrophorèse en gélose.*

L'un des avantages de la cuve que nous avons conçue est de permettre la réalisation de formats variables à volonté dans le sens de la largeur. C'est ainsi que l'on peut se servir de plaques de gélose de 240 × 180 mm ou de bandes dont la largeur est réglable de 0 à 240 mm. Il suffit pour cela de disposer de plaques de verre du format désiré.

— *Grand format.*

Pendant que la gélose tamponnée fond au bain-marie bouillant dans lequel sont également réchauffées les pipettes, préparer la cuve.

Pour cela, après un contrôle d'horizontalité, recouvrir la table d'électrophorèse d'une plaque de verre photographique de 240 × 180 mm enduite d'un film de gélose à 1 %, sans sel, étalé au doigt et séché à l'étuve à 80° C. Cette précaution confère une bonne adhérence à la gélose qui sera versée par la suite.

Mettre en place les deux plaques d'arrêt latérales en les appliquant contre les règles Z et en utilisant la face qui leur donne la position la plus profonde. Les maintenir à l'aide des six cales cylindriques (trois de chaque côté) que l'on pose aisément en plaçant l'emboul de caoutchouc contre la paroi de la cuve et l'extrémité opposée contre la plaque d'arrêt. Une fois en place, les cales doivent être horizontales et au niveau du bord supérieur des électrodes. L'une doit être au centre, les deux autres aux extrémités de la plaque d'arrêt.

On crée de la sorte, de chaque côté de la table d'électrophorèse une tranchée dans laquelle s'écoulera une partie de la gélose. Pour en parfaire l'étanchéité, couler à la pipette un joint de gélose suivant toutes les lignes de fuite possibles. Laisser refroidir quelques instants, puis verser la totalité de la gélose prévue sur le centre de la plaque de verre. Ce volume se calcule aisément en fonction de l'épaisseur de gel désirée. Le refroidissement de celui-ci est beaucoup accéléré par la circulation d'eau. Pendant le refroidissement, fermer la cuve avec une plaque de verre qui freine l'évaporation. Une fois la gélose solidifiée, enlever cales et plaques d'arrêt par simple glissement vers le haut. Découper ensuite ; à l'emporte-pièce et à l'endroit désiré, les cuvettes destinées à recevoir le mélange à analyser, lui-même dilué dans de la gélose. Lorsque ces cuvettes doivent être alignées, il est facile d'y parvenir en se servant d'une règle que l'on pose sur les règles du plateau central. Le remplissage terminé, garnir les bacs latéraux de tampon jusqu'à affleurement des orifices de trop-plein orientés vers le haut. Les retombées latérales de gélose baignent alors directement dans le tampon dont l'arrivée doit être réglée goutte à goutte, et non en un filet continu qui provoquerait un circuit secondaire au travers de la réserve de tampon. La cuve peut ensuite être fermée et mise sous tension. La valeur initiale du voltage choisi baissera légèrement au début de l'électrophorèse par suite de l'échauffement progressif du gel et de la diminution de sa résistance. Elle pourra être rétablie sans difficultés en agissant sur le potentiomètre du bloc d'alimentation.

Pendant l'électrophorèse, le couvercle de la cuve se cintre quelque peu sous l'action de la chaleur et de l'humidité. Il n'est pas nécessaire de contrecarrer cette déformation par des surcharges, car elle disparaît spontanément après refroidissement et séchage.

Lorsque la séparation électrophorétique est suffisante, découper la plaque de gélose au scalpel ou à la spatule suivant le périmètre du verre. Décoller celui-ci du plexiglas à l'aide d'une spatule de dentiste et sortir la plaque de la cuve. Procéder ensuite à la fixation, au séchage et à la coloration suivant les méthodes originales.

— *Format réglable.*

La largeur de la plaque peut être choisie à volonté jusqu'à un maximum de 240 mm.

On place par exemple sur le plateau central une plaque de verre de 180×40 mm préparée comme ci-dessus. On l'encadre ensuite par deux grands ponts mobiles et l'on met en place les deux plaques d'arrêt latérales maintenues par quatre cales situées vis-à-vis des ponts. Les joints d'étanchéité sont faits à la pipette, comme précédemment. Une fois que la totalité de la gélose est coulée et refroidie, on enlève les plaques d'arrêt en laissant en place les ponts. Les opérations suivantes sont les mêmes que pour une plaque de grand format.

On ne manquera pas de noter que deux, trois, quatre, cinq ou six plaques de 180×40 mm peuvent être traitées simultanément de la même façon. Chacune d'elles peut être

enlevée individuellement de la cuve au moment choisi, par découpage de la gélose, alors que l'électrophorèse continue pour les plaques restantes.

On peut aussi se contenter d'utiliser un seul pont mobile en se servant de l'une des règles du plateau central comme second bord.

Finalement, on peut encore envisager l'électrophorèse simultanée de plaques de gélose d'épaisseurs différentes, chacune d'elles étant séparée de sa voisine par un pont.

d) *Immunoélectrophorèse en gélose*

Après électrophorèse simple en gélose telle qu'elle vient d'être décrite, il suffit de découper dans le gel les cuvettes longitudinales destinées à l'immunsérum. Cette opération est grandement facilitée dans notre cas en remettant en place les plaques latérales qui servent de supports à la règle le long de laquelle on fait glisser le scalpel. Les manipulations ultérieures sont strictement conformes à la technique originale de P. GRABAR et C. A. WILLIAMS (1953).

e) *Micro-immunoélectrophorèse.*

On sait que dans cette méthode, élaborée par J. J. SCHEIDEGGER (1955), au lieu d'utiliser de grandes plaques de gélose, on se sert de lames porte-objet pour histologie, de dimensions standard (75×27 mm).

Pour faire de telles microélectrophorèses dans notre cuve, il convient de placer au milieu de la table d'électrophorèse, dans le sens de sa longueur, la plaque de surélévation. On pose ensuite sur cette dernière un maximum de neuf lames porte-objet enduites d'un film de gélose sèche ; puis, on l'encadre latéralement, avec un écart de 5 mm, par les règles d'arrêt que l'on charge de poids quelconques pour les immobiliser. Les joints d'étanchéité se font à la pipette et après leur refroidissement on recouvre les lames d'une quantité calculée de gélose. Lorsque celle-ci est solidifiée, les règles d'arrêt sont enlevées et on dépose le sérum suivant le procédé original. Pour faire monter le tampon sur le plateau et l'amener au contact direct de la gélose, il suffit d'obturer les tubes de trop-plein en les coiffant de caoutchouc ou de pincer leurs conduits d'écoulement. Bien que réalisable, un renouvellement continu du tampon n'est pas nécessaire ici, car l'électrophorèse a une durée réduite. Lorsque celle-ci est terminée, on découpe la gélose suivant les bords longitudinaux de la plaque d'arrêt. Si toutes les lames doivent subir un même traitement ultérieur, on peut se servir de la plaque de surélévation comme support et les manipuler ensemble. Dans le cas contraire, on les découpe pour les traiter individuellement.

Il est intéressant de savoir que, si l'on fait uniquement des électrophorèses simples dans cette microméthode, par exemple pour un travail en série ou préliminaire, il est loisible de remplacer les lames multiples par une plaque unique de 240×76 mm qui donnera la possibilité d'analyser 24 échantillons simultanément.

A l'opposé, il est possible aussi de faire des essais avec une lame unique ou d'une autre largeur en se servant des petits ponts mobiles qui sont prévus pour l'encadrer. Naturellement faudra-t-il alors réaliser une étanchéité relative entre la table d'électrophorèse et la plaque de surélévation par des joints de gélose en dehors de l'aire délimitée par les ponts.

Pour la partie immunologique des essais, la technique employée sera identique à celle décrite par J. J. SCHEIDEGGER.

f) *Electrophorèse en bloc d'amidon.*

Le bloc d'amidon préconisé par H. G. KUNKEL et R. J. SLATER (1952) pour cette méthode se désagrégerait au contact direct du tampon. Pour éviter cet inconvénient, on délimite le moule dans lequel l'amidon doit être coulé avec les mêmes accessoires que pour la

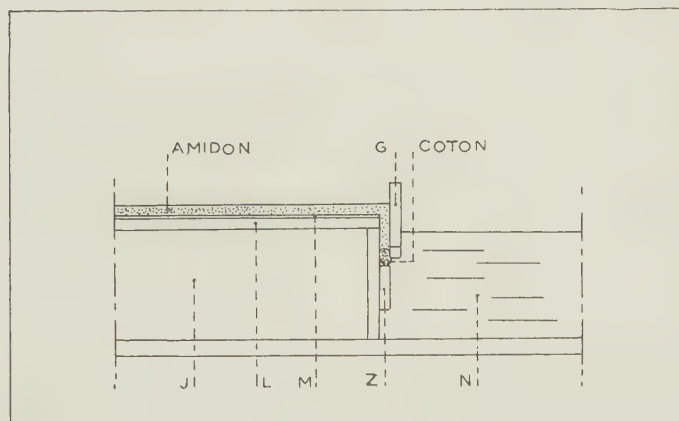


FIG. 22. — Coupe transversale d'une partie de la table d'électrophorèse montrant le détail de la connexion du bloc d'amidon et du tampon.

gélose, mais en se servant de la seconde face des plaques d'arrêt latérales qui se trouvent alors en position haute et laissent une fente à la base des tranchées formées (fig. 22, ci-contre). Pour obturer cette fente, on bourre le fond des tranchées de coton hydrophile. La suspension d'amidon peut alors être coulée normalement, en commençant par le remplissage des tranchées et en opérant en plusieurs fois afin de prévenir un affaissement ultérieur du substrat dans ces régions. Une légère fuite du tampon n'est pas un inconvénient puisqu'elle facilite l'essorage du bloc. Cet assèchement

peut se compléter par application de papier filtre sur la face supérieure du bloc. Lorsque la consistance désirée est atteinte, on dépose le mélange à analyser par insertion dans une fente du bloc, on nettoie si nécessaire les bacs à tampon, puis, après remplissage, on procède à l'électrophorèse. La suite des opérations reste conforme aux techniques originales. On notera qu'ici encore le format peut être choisi librement dans le cadre des dimensions limites.

g) *Electrophorèse en gel d'amidon.*

Dans la cuve à usages multiples, la mise en œuvre de la méthode de O. SMITHIES (1955) est très simplifiée. La délimitation du moule de grand ou petit format se fait comme pour la gélose, après avoir protégé la table d'électrophorèse par une plaque de verre. Les joints d'étanchéité sont devenus superflus, car le gel est suffisamment visqueux pour ne pas donner lieu à des fuites. Pour le démoulage, au lieu de faire glisser les plaques d'arrêt, il est préférable de les écarter du gel en commençant par la base. Au besoin, on s'aidera d'un scalpel pour en libérer les arêtes. Il est ensuite recommandé de remettre en place les plaques pour la durée de l'électrophorèse, en utilisant leur seconde face, car nous avons constaté dans certains cas, et surtout du côté anodique, un gonflement du gel qui peut amener une rupture de connexion. La pression des plaques empêche de tels incidents.

Dans la technique originale, le gel doit être parfaitement couvert par un couvercle qui empêchera sa dessiccation. Cette précaution devient superflue dans notre dispositif, car le couvercle de la cuve réduit suffisamment l'évaporation pour que celle-ci ne perturbe plus l'électrophorèse et que les séparations soient excellentes dans l'épaisseur

du gel. C'est cette partie centrale qui est découpée et colorée après sortie de la cuve, à l'aide d'un fil métallique très fin du type magnétophone.

De plus, alors que dans le dispositif décrit par SMITHIES il faut autant de moules en plexiglas que de formats désirés, notre appareil permet de faire varier la largeur des plaques de gel à volonté. La seule difficulté réside dans l'obtention de quantités plus grandes de gel homogène et sans bulles d'air. Elle peut être éliminée en employant pour sa préparation des récipients de plus grande taille et une surface de chauffe suffisante.

Comme on peut le constater, la cuve à usages multiples que nous venons de décrire est d'un maniement simple et comporte un champ d'application fort large. Si nous essayons de résumer ses avantages, nous dirons qu'elle permet de réaliser, dans un même appareil, toute une série de techniques pour lesquelles il fallait jusqu'à présent autant de dispositifs différents. Cette polyvalence est obtenue non pas au détriment de la qualité des résultats, mais s'accompagne au contraire, à qualité égale, de simplifications opératoires appréciables. L'une des plus importantes réside dans la suppression des connexions de papier filtre entre les gels et le tampon. L'éventail des possibilités offertes est particulièrement intéressant pour les chercheurs individuels qui ne veulent pas restreindre leurs essais à une technique unique, mais qui cherchent à tirer de la comparaison de plusieurs méthodes des résultats souvent insoupçonnés. Or, pour les Naturalistes le champ d'application est ici des plus vastes. Les résultats que nous avons obtenus avec le sérum de *Carcinus maenas* en seront la meilleure démonstration.

C. — Electrophorèse en gélose du sérum de *Carcinus maenas*.

L'électrophorèse en gélose a déjà été employée en 1949 par A. H. GORDON et Coll. Mais ses modalités ont surtout été mises au point par P. GRABAR et C. A. WILLIAMS (1953, 1955) lors de l'élaboration de la méthode immunoélectrophorétique. Elles constituent un mode opératoire très précis qui n'est encore que peu connu des Naturalistes et que, pour cette raison, il sera utile de décrire en détail en signalant les modifications que nous y avons apportées.

1. Technique utilisée.

L'hémocyanine des Crustacés a un point isoélectrique voisin de celui de la sérum-albumine humaine (4,7). Il nous a donc paru judicieux d'employer un support identique à celui qui donne d'excellents résultats dans l'électrophorèse du sérum humain, notamment une gélose à 1,25 %, tamponnée à pH 8,2.

a) Préparation de la gélose.

Dans une boîte de Roux, à 400 cc d'eau distillée neutre, ajouter 30 g d'une gélose bactériologique de première qualité (Difco ou Oxoid). Solubiliser cette gélose au bain-marie bouillant en agitant de temps à autre, puis la couler dans une cuvette émaillée de 350 × 250 mm par exemple. Après refroidissement, découper la plaque formée en petits cubes d'environ 1 cm de côté. Laver ceux-ci pendant trois jours dans de l'eau distillée neutre que l'on renouvelle deux fois par jour. Etaler ensuite ces cubes en cou-

che unique sur papier filtre pour absorber leur eau périphérique. En peser quatre ou cinq dans un vase à tarer et les amener à siccité complète par séjour à l'étuve à 110° C. Pendant ce temps, peser la totalité des cubes restants et les conserver dans un ballon de 2 litres clos, en chambre froide. A partir du poids de la gélose sèche, calculer la teneur du gel en matière sèche. Dans les conditions décrites, cette teneur est, en général, voisine de 4 %.

Préparer alors la gélose tamponnée de la manière suivante :

Faire fondre à nouveau au bain-marie bouillant la quantité connue de gélose lavée du ballon de 2 litres, en y ajoutant une quantité d'eau distillée neutre telle que le taux de gélose soit ramené à 2,5 %. Prélever 20 ml de cette gélose diluée et la répartir dans une dizaine de tubes à hémolyse contenant chacun deux gouttes d'une solution aqueuse à 1 % d'éthylmercuthiosalicylate de sodium qui sert d'antiseptique. Cette réserve de gélose non tamponnée servira à la dilution du sérum pour son dépôt dans la plaque d'électrophorèse. Elle se conserve fort bien sous cette forme dans un flacon bouché dont le fond est garni d'eau et de merthiolate.

Au reste de la gélose diluée du ballon dont le volume est toujours connu, ajouter une quantité égale de tampon chaud à pH 8,2 et de concentration 0,05 M. La formule de ce tampon est :

Véronal sodique	47,586 g
Eau distillée neutre	3 litres
HCl N/10	0,690 litre

Vérifier le pH et, si besoin, l'ajuster à 8,2.

Compléter à l'eau distillée neutre jusqu'à un volume total de 4,265 litres.

Cette opération dilue la gélose à 1,25 % et la rend conductrice. Une dernière purification est réalisée par filtration sous pression réduite, sur Buchner garni de papier filtre pour gélose, tout le matériel étant naturellement préchauffé par rinçage à l'eau distillée bouillante.

Finalement, la gélose filtrée est répartie dans des erlenmeyers dont la contenance est choisie en fonction des dimensions des plaques de gélose que l'on se propose de couler. Des récipients de 100 et 250 ml conviennent pour les formats les plus courants. Ils renferment respectivement 1 et 2,5 ml de merthiolate au 1/100 et, après remplissage, sont fermés hermétiquement et conservés au frais jusqu'à l'emploi.

b) *Préparation des plaques.*

A l'usage, la marche à suivre que nous avons adoptée et qui va être décrite, s'est avérée particulièrement commode.

L'erlenmeyer contenant la quantité désirée de gélose tamponnée est réchauffé dans une bouilloire électrique de 1,5 à 2 litres qui fait office de bain-marie bouillant. Pour éviter toute ébullition désordonnée, cet appareil est placé sous le contrôle d'un régulateur bilame. On y chauffe en même temps une éprouvette à pied de 50 ml contenant de l'eau distillée dans laquelle plonge une pipette de 1 ml, graduée au 1/10, pour la préparation du mélange à analyser. Sur son bord, on place encore, serré dans une pince métallique à coussinets de caoutchouc, un tube à hémolyse avec de la gélose à 2,5 % non tampon-

née. Lorsque la gélose de l'ermenmeyer est entièrement fondue, on procède à sa coulée dans la cuve à électrophorèse comme il a été indiqué plus haut. Une épaisseur de 4 mm a été adoptée en général. Pendant la solification du gel, on prépare dans un bain-marie à 45° et sans jamais dépasser cette température, le mélange gélose-sérum de *Carcinus maenas*. Celui-ci s'obtient en versant dans un tube à hémolyse tiède successivement 0,5 ml de gélose à 2,5 % sans sel, 0,3 ml d'eau distillée à 45° C et 0,2 ml de sérum, en ayant soin d'homogénéiser chaque fois à l'aide d'un agitateur fin préchauffé. La quantité de sérum doit être augmentée ou diminuée suivant la richesse de l'hémolymphé en protéines. A l'approche de la mue, par exemple, 0,1 ml de sérum est amplement suffisant.

Pendant que la température du mélange s'équilibre au bain-marie, on découpe à l'emporte-pièce dans la plaque de gélose refroidie une cuvette de dimensions et de forme appropriées. Pour éviter toute fuite par la base, on y coule immédiatement une goutte de gélose tamponnée à 1,25 %. Avec une pipette fine à pointe incurvée, préchauffée par rinçage, on dépose ensuite 0,2 cc du mélange gélose-sérum. Il est bon de recouvrir ce dépôt d'un peu de gélose supplémentaire qui s'étalera légèrement en dehors des limites de la cuvette, mais aura l'avantage de la renforcer.

Alors que pour le sérum humain la ligne de départ est généralement placée au milieu de la plaque, pour le sérum de Crabe, il est préférable de la décaler vers la cathode, en la plaçant par exemple à 60 mm du bord de la plaque.

c) *Electrophorèse.*

Une fois le mélange à séparer en place, l'électrophorèse est conduite comme il a été indiqué lors de la description de la cuve à usages multiples. Il faut noter toutefois que, comme le milieu intérieur des Crustacés a une concentration saline relativement élevée et qu'une différence de salinité trop considérable entre le mélange déposé et la gélose environnante peut entraîner des cassures du gel à ce niveau, il est recommandé de laisser diffuser les sels pendant une demi-heure avant le passage du courant.

A 110 volts, une durée de passage du courant de 4 h à 4 h 30 est très suffisante. Elle peut naturellement être prolongée lorsqu'on désire une résolution supérieure.

d) *Fixation.*

Après découpage au scalpel, les plaques de gélose sont fixées par immersion pendant deux heures dans un bain aqueux d'acide acétique à 2 %. Celui-ci précipite les protéines et rend visible les plus abondantes sous forme de taches blanches.

e) *Séchage.*

Après fixation, la gélose est recouverte de deux feuilles de papier filtre épais (Arches n° 304) de mêmes dimensions, que l'on mouille au préalable à l'eau distillée. Après avoir contrôlé l'absence de toute bulle d'air entre la gélose et le papier, les plaques sont mises à l'étuve à 45° C jusqu'à dessiccation complète (une nuit environ).

Le rôle du papier consiste à absorber l'eau et les sels de la gélose, car une persistance de ces derniers enlèverait la transparence du support.

Une fois le papier filtre enlevé de la plaque sèche, celle-ci est rincée sous un filet d'eau, afin d'éliminer les fibres celluloses qui y adhèrent et on passe à la coloration.

f) *Colorations et lavages.*— *Coloration générale des protéines.*

Les colorants utilisés sont les mêmes que ceux qui servent pour les protéines du sérum humain. Nous avons employé l'Amidoschwarz 10 B qui donne une teinte bleu noir et l'Azocarmin G qui révèle les protéines sous forme de taches rouges. La seconde coloration est moins intense que la première, mais délimite plus nettement les surfaces occupées par les protéines. Elle facilite donc la distinction de bandes très voisines comme on les trouve au niveau de l'hémocyanine.

Rappelons les formules des solutions colorantes :

Amidoschwarz 10 B

Tampon acétate	900 ml
Glycérine	100 ml
Amidoschwarz	1 g

Azocarmin G.

Tampon acétate	900 ml
Glycérine	100 ml
Azocarmin G	0,500 g

Tampon acétate.

Acide acétique N (60 g/l)	500 ml
Acétate de Na 3H ₂ O N/10 (13,6 g/l)	500 ml

Les plaques d'électrophorèse séchées et rincées sont immergées pendant cinq heures dans l'un ou l'autre des deux colorants, puis lavées pendant deux heures dans une solution de lavage de formule :

Eau distillée	830 ml
Acide acétique	20 ml
Glycérine	150 ml

Cette solution est renouvelée au bout de la première heure. Le lavage peut être considéré comme terminé lorsque le fond de gélose est redevenu incolore. Chaque fois qu'une photométrie est prévue, les conditions de coloration et de lavage doivent être strictement standardisées.

Les plaques sont ensuite séchées à l'étuve à 37° C pendant vingt-quatre heures. La présence de glycérine dans les bains de lavage rend possible le décollement du film de gélose de son support de verre. Cette forme de stockage rend possible une conservation indéfinie des documents sous un volume très réduit. Lorsque, pour une manipulation plus aisée, on choisit de laisser la gélose sur le verre, on peut supprimer la glycérine et faire les lavages simplement avec une eau acétique à 2 %.

— *Coloration des lipoprotéines.*

Nous avons adopté la technique au noir Soudan mise au point par J. URIEL et J. J. SCHEIDEGGER (1955).

Le réactif se prépare de la manière suivante :

Alcool absolu	600 ml
Eau distillée	400 ml
Noir Soudan	1,2 g

Chauffer jusqu'à l'ébullition. Laisser refroidir à la température ambiante. Filtrer en répartissant dans de petits flacons colorés de 250 ml. Bien boucher et conserver à l'obscurité. Au moment de l'emploi, ajouter 0,1 ml de soude à 25 % par 50 ml de solution colorante. Cette solution ne sert qu'une fois.

Pour la coloration des lipoprotéines, les plaques séjournent pendant deux heures dans le colorant, en récipient soigneusement clos. Elles sont ensuite lavées deux fois quinze minutes dans un bain d'alcool à 50 %, puis séchées à l'étuve à 37° C. Le décollement du film de gélose peut être obtenu par immersion de cinq heures dans un bain d'eau glycérinée à 15 %.

— *Coloration des glycoprotéines.*

Dans cette technique (J. COURCON, J. URIEL, 1958), le réactif comporte :

- Acide périodique à 1 % dans l'alcool à 50 % ;
- Solution aqueuse 0,01 M de p-phénylènediamine ;
- Solution aqueuse 0,01 M d' α -naphtol ;
- Eau oxygénée à 10 volumes.

Pour la coloration, les plaques sèches séjournent pendant quinze minutes dans la solution périodique, puis sont lavées pendant cinq minutes dans l'eau distillée. On les plonge ensuite durant cinq minutes dans 50 ml de solution d' α -naphtol + 50 ml de solution de p-phénylènediamine + 10 ml d'eau oxygénée. Après un lavage de cinq à dix minutes dans l'eau courante, les plaques peuvent être séchées à l'étuve à 37° C et les glycoprotéines sont concrétisées sous forme de taches violacées.

g) *Microélectrophorèse.*

Dans le cas de recherches préliminaires, il n'est pas toujours indispensable d'atteindre la précision et la finesse de la technique que nous venons de décrire. Par exemple, lorsqu'il s'agit de sélectionner parmi un grand nombre de sérums de composition inconnue ceux qui renferment la fraction intermédiaire ou ceux qui en sont dépourvus, on peut se contenter de la réponse rapide et suffisante que donne la microméthode dont nous nous sommes servi. Celle-ci offre en plus la possibilité de travailler sur des animaux encore plus petits, la quantité exigée n'étant plus que de l'ordre du microlitre.

Cette technique est facilement réalisable dans la cuve à usages multiples. Il suffit d'équiper celle-ci avec les accessoires prévus à cet effet. Comme toujours, la quantité de gélose se calcule en fonction du format et de l'épaisseur des plaques désirées. Rappelons que l'on peut se servir d'une lame porte-objet unique ou d'un nombre croissant allant jusqu'à 9. Lorsqu'on choisit le format 240 $\times$ 75 mm, il devient possible d'analyser 24 échantillons simultanément (fig. 23, page 134). On peut aussi remplacer les lames porte-objet par des plaques pour diapositives 50 $\times$ 50 mm, ce qui permet, après séchage et coloration, de disposer de documents prêts à la projection, sans aucun montage particulier.

Les cuvettes de dépôt se découpent aisément, sous aspiration buccale, à l'aide d'une canule de verre à bord tranchant, d'un diamètre allant de 1 à 2 mm. Elles ont intérêt, dans le cas du sérum de Crabe, à être rapprochées du bord cathodique de la plaque afin de pouvoir tenir compte de la migration surtout anodique de l'hémocyanine et des glycoprotéides. L'introduction du sérum se fait avec des micropipettes à extrémité très fine et jaugées au mercure. Etant donné les dimensions très réduites de la cuvette, le sérum peut être déposé directement, sans mélange préalable avec de la gélose. De bonnes figures électrophorétiques sont obtenues couramment avec des volumes de sérum de l'ordre du microlitre.

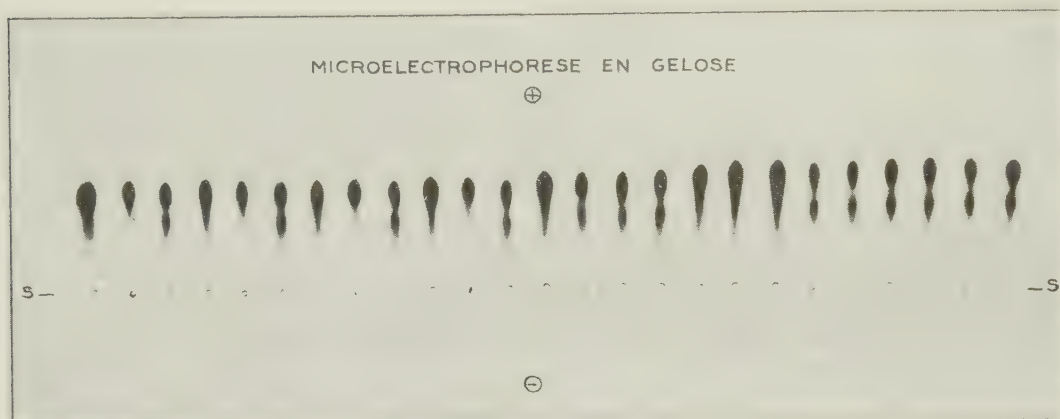


FIG. 23. — Microélectrophorèses simultanées en gélose de 24 sérums de Crabes.

Les séparations peuvent être suffisantes après une heure et demie ou deux heures de passage d'un courant de 110 volts. La courte durée de l'expérience dispense d'un renouvellement continu du tampon. Elle suffit pour obtenir une migration de 25 mm de l'hémocyanine vers l'anode et un déplacement de 5 mm des lipoprotéines vers la cathode. Après séchage, fixation et coloration suivant les techniques ordinaires, l'emplacement des protéines est marqué par des taches ovalaires précédées et suivies de zones plus claires qui donnent à l'ensemble un aspect de flammes.

Etant donné la brièveté de la phase électrophorétique proprement dite, les résultats qualitatifs peuvent être obtenus dans la journée pour 24 échantillons, ce qui permet de mettre en route sans délai de nouveaux essais plus précis.

2. Rappel des propriétés des hémocyanines.

Les résultats les plus intéressants apportés par l'électrophorèse en gélose concernent l'hémocyanine. Avant de les exposer, il peut donc être utile de rappeler brièvement nos connaissances relatives à cette protéine.

Les hémocyanines sont des chromoprotéides non porphyriniques renfermant du cuivre à l'état cuivreux.

Elles sont très répandues chez les Invertébrés et ont été signalées chez les Mollusques (Lamellibranches, Gastéropodes., Céphalopodes) et les Arthropodes (Xiphosures, Scorpions, Crustacés).

Leur couleur varie suivant les espèces et peut aller du bleu violet chez *Helix pomatia* au vert chez *Eledone moschata*. Chez les Crustacés, cette teinte présente des nuances qui vont du bleu sombre au bleu vert. Il nous semble d'ailleurs que ces nuances ne sont pas propres aux hémocyanines elles-mêmes, mais dues au mélange avec d'autres substances telles que les caroténoïdes ou les lipoprotéines.

Les hémocyanines diffèrent aussi par leurs formes cristallines. C'est ainsi que celle d'*Helix pomatia* cristallise en octaèdres du système quadratique, alors que chez certains Crustacés du genre *Palinurus* on obtient des rhombododécaèdres.

Mollusques et Crustacés divergent encore par la teneur de leurs hémocyanines en cuivre. Le taux de 0,245 à 0,260 % des premiers s'abaisse à 0,17 - 0,18 % chez les seconds.

Ces chromoprotéides se comportent comme des euglobulines et précipitent à leur point isoélectrique (4,7 chez les Crustacés ; 4,7 à 5,1 chez les Mollusques ; 6,3 chez les Néphroses) en l'absence de sels. On peut donc les préparer par dialyse contre l'eau distillée. Mais alors que d'autres euglobulines précipitent immédiatement après une courte dialyse, les hémocyanines, grâce à leurs propriétés plus acides, restent dissoutes plus longtemps et peuvent être séparées du premier précipité euglobulinique qui se forme.

On peut encore les préparer par précipitation à saturation au sulfate de magnésium ou à 40 % de saturation par le sulfate d'ammonium. Une précipitation accélérée s'obtient par acidification à l'acide chlorhydrique dilué ou passage de CO_2 .

Les hémocyanines obtenues par toutes ces méthodes sont solubles dans des solutions physiologiques 0,2 M.

L'un des chapitres les plus intéressants de l'étude de ces chromoprotéides est celui de leurs poids moléculaires et de nombreuses recherches ont déjà été effectuées à leur sujet.

Ces poids moléculaires ont été calculés à partir des constantes de sédimentation en ultracentrifugation ou à l'aide des coefficients de diffusion de la lumière, ou encore par des mesures osmométriques. Les résultats fournis par ces différentes techniques ne sont pas toujours très concordants, mais ils le sont assez pour qu'on puisse les considérer comme valables. Ceux qui ont été déduits de l'ultracentrifugation nous intéresseront plus particulièrement ; ils sont dus aux travaux de B. ERIKSON-QUENSEL et T. SVEDBERG (1936) et T. SVEDBERG et K. O. PEDERSEN (1940).

En premier lieu, on a constaté que les constantes de sédimentation des hémocyanines varient avec leurs origines. C'est ainsi que celles des Crustacés sont 16,9 ; 23,4 ou 34,1 ; qu'elles s'élèvent à 57,1 chez les Céphalopodes et à 99,8 chez les Gastéropodes. Ces valeurs correspondent à des poids moléculaires respectifs de 360.000, 640.000 et 1.310.000 pour les Crustacés, 2.750.000 et 5.100.000 pour les Mollusques.

Cependant, on a remarqué que ces valeurs diminuaient après dilution des solutions d'hémocyanines. Il apparaît ainsi que les poids moléculaires de ces substances ne peuvent avoir de valeurs définies que dans des conditions précises de pH, de température et de solvants. En effet, des variations relativement faibles de ces conditions amènent les macromolécules hémocyaniques à se scinder en unités plus petites ou, au contraire, à se grouper en agrégats plus volumineux. Ces systèmes ont été étudiés en détail et on a pu établir que les réactions d'association et de dissociation sont réversibles dans certaines limites de pH. Les dissociations peuvent être provoquées par des rayons ultra-violets, par

les ultra-sons, par certaines concentrations en urée, l'action de substances telles que la guanidine et la clupéine. Il semble que le clivage se fasse toujours suivant l'axe majeur des molécules.

Chez certains animaux comme le Xiphosure *Limulus polyphemus*, il y a coexistence des différents formats moléculaires. On y trouve notamment les quatre constantes de sédimentation 56,6 ; 34,6 ; 16,1 et 5,9. Ces valeurs signalent l'existence de quatre sortes de molécules, mais on sait aussi que ces composants n'existent pas à n'importe quel pH. Ils ne sont stables tous ensemble que pour des pH variant entre 5,2 et 10,5. Dans un milieu plus basique, les trois premiers sont remplacés par le quatrième et à un pH inférieur à 5,2, les transformations sont encore plus complexes.

On sait de même que chez *Helix pomatia* l'hémocyanine se compose de quatre sortes de molécules, le type le plus lourd n'étant décelable qu'en solution neutre. Cette macromolécule se dissocie en composants plus petits à pH 4,6 ou 7,4.

Notons encore que des différences de taille moléculaire se manifestent quelquefois d'une espèce animale à une espèce voisine. C'est ainsi qu'on a constaté que *Helix pomatia* et *Helix nemoralis* ont des hémocyanines de mobilités électrophorétiques différentes. Lorsqu'on fait un mélange des deux substances, qu'on les amène d'abord à un pH pour lequel elles se dissocient, puis au voisinage de leur point isoélectrique, il se forme des molécules mixtes qui comportent à la fois des molécules des deux types originaux. L'électrophorèse d'un tel mélange, fait par A. TISELIUS et F. L. HORSFALL (1939), a donné une frontière très large avec grand nombre d'hémocyanines de mobilités intermédiaires. Des espèces zoologiquement plus distantes donnent aussi des molécules mixtes, mais avec moins de facilité.

Quelles sont nos connaissances dans ce domaine en ce qui concerne les Crustacés ?

L'hémocyanine a été signalée chez de nombreuses espèces de ce groupe. T. SVEDBERG et K. O. PEDERSEN (1940) en ont déterminé les constantes de sédimentation, mais donnent assez peu de poids moléculaires correspondants.

La classe des Malacostracés peut être divisée en deux groupes. Le premier renferme des animaux dont la constante de sédimentation est de l'ordre de 16 ou 17, ce qui représente un poids moléculaire de 440.000 à 510.000. Ce sont par exemple *Pandalus borealis* (17,4), *Palaemon fabrici* (16), *Palinurus vulgaris* (16,4), *Jasus lalandii* (17,1), *Pagurus striatus* (16), *Eupagurus bernhardus* (17). Un second groupe comporte des espèces dont la constante S_{20} se situe de 23 à 27. Ce sont : *Nephrops norvegicus* (24,5), *Homarus vulgaris* (22,6), *Astacus fluviatilis* (23,3), *Hyas araneus* (23), *Maia squinado* (27), *Cancer pagurus* (23,6) et *Carcinus maenas* (23,3). De telles valeurs correspondent à des poids moléculaires de l'ordre de 700.000 à 800.000.

Ajoutons que chez certaines de ces espèces, à côté du composant majeur dont les constantes de sédimentation viennent d'être données, on rencontre des composants mineurs avec d'autres caractéristiques. Ainsi, chez *Eupagurus bernhardus*, à côté du composant $S_{20} = 17$, il y a une petite quantité de molécules dont $S_{20} = 22$. Chez *Cancer pagurus*, le composant $S_{20} = 23,6$ est accompagné d'une fraction mineure de $S_{20} = 16,7$. Il en est de même pour *Carcinus maenas* qui nous intéresse plus particulièrement et chez lequel on signale, à côté d'une hémocyanine de $S_{20} = 23,3$, des molécules plus petites dont la constante de sédimentation est 16,7.

J. ROCHE et Y. DERRIEN (1939, 1940) confirment de tels résultats par l'étude de la précipitation des diverses hémocyanines par le sulfate d'ammonium. Ils signalent que ces hémocyanines présentent des caractères physico-chimiques propres à l'espèce animale étudiée et que, suivant l'origine, la précipitation par le sulfate d'ammonium peut varier. Des recherches qu'ils ont faites sur les hémocyanines de *Cancer pagurus*, *Eledone moschata*, *Octopus vulgaris* et *Sepia officinalis*, ils déduisent une spécificité de ces protéines. Ils notent également qu'elles se comportent comme des substances hétérogènes en soulignant que l'existence d'une ou de plusieurs fractions dans la solution d'hémocyanine à pH 6,15 n'est nullement caractéristique de certaines espèces, ni constante chez divers animaux appartenant à l'une de celle-ci. Ils en concluent que, du point de vue physico-chimique, une solution de protéines doit être considérée à certains égards comme renfermant un mélange de corps.

A notre connaissance, l'hétérogénéité de l'hémocyanine de *Carcinus maenas* n'a jamais été mise en évidence avec netteté par électrophorèse libre ou en électrophorèse de zone. Les travaux de A. TYLER et C. B. METZ (1945), qui ont déjà été cités, concernent *Panulirus interruptus* et ne mentionnent qu'une hémocyanine homogène, les autres fractions protéiques étant de nature non hémocyanique et pouvant en être séparées sans difficultés. On se souvient aussi que si les essais de F. J. JOUBERT (1954) sur *Jasus lalandii* mettent en évidence plusieurs fractions, les conditions expérimentales n'autorisent pas à dire si la fraction mineure est vraiment une hémocyanine. Il peut fort bien s'agir de protéines appartenant au groupe I de nos séparations. Seules les expériences faites avec un tampon véronal subdivisent le clocher hémocyanique, mais elles n'ont malheureusement pas été poursuivies.

Cet aperçu un peu long et néanmoins partiel de la physico-chimie des hémocyanines était nécessaire pour montrer l'intérêt passionnant de cette question et l'étendue du domaine qui reste à explorer. A sa lumière, nous pouvons à présent examiner nos propres résultats.

3. Résultats.

Tout d'abord, l'électrophorèse en gélose a confirmé chez *Carcinus maenas* l'existence des trois groupes protéiques déjà décelés sur papier (fig. 24, page 138).

La fraction distale, de migration anodique, comporte toujours l'hémocyanine et se déplace plus rapidement que la sérumalbumine humaine qu'elle dépasse, dans nos conditions expérimentales, de 2 ou 3 cm. La tache qui la concrétise est moins étalée que celle de la sérumalbumine, ce qui s'explique aisément par la différence de poids moléculaire des deux protéines (albumine = 66.000 ; hémocyanine de *Carcinus maenas* = 800.000). La vitesse de diffusion de l'hémocyanine dans la gélose est évidemment moindre que celle de la sérumalbumine.

a) Fractionnement de l'hémocyanine en gélose.

Lorsque la durée de l'électrophorèse est suffisamment longue et la cuvette de dépôt assez étroite — ce que nous obtenons par des moules en plexiglas d'un millimètre d'épaisseur — on constate que la fraction distale se démultiplie en deux ou trois fractions secondaires (fig. 25, page 139), ce qui met en évidence l'hétérogénéité du groupe. Ce fait s'ob-

serve particulièrement bien après coloration à l'azocarmin. Parmi les trois sous-fractions que nous avons pu observer, la plus rapide reste la plus importante. La seconde, plus faible, se détache assez mal de la précédente et peut se confondre avec un effet de traînée. La troisième, à peu près équivalente à la deuxième, s'en sépare de façon nette et se situe à environ 1 cm en arrière de la fraction principale.

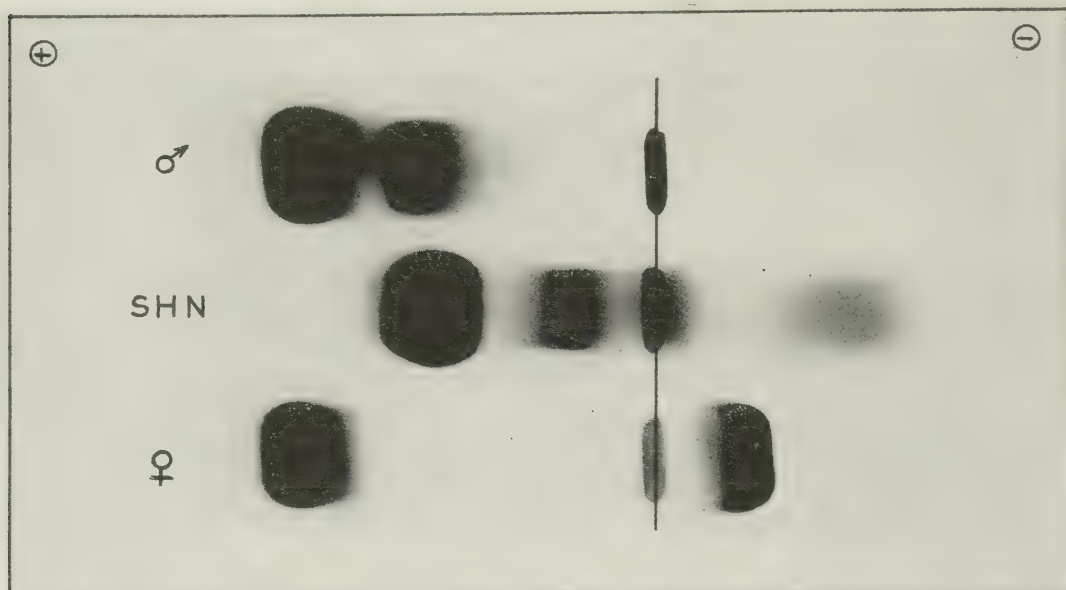


FIG. 24. — Electrophorèses comparées, en gélose, de sérums de Crabes ♂ et ♀ et d'un sérum humain.

Du fait de leur proximité, ces sous-groupes n'apparaissent pas dans la courbe photométrique sous forme de clocher séparé, mais sous forme d'inflexions plus ou moins accentuées de la pente cathodique du clocher distal.

Quelle peut être l'interprétation de ce fractionnement du groupe protéinique le plus rapide ? A priori, il n'est pas exclu qu'il s'agisse de protéines différentes de l'hémocyanine, mais de mobilités électrophorétiques voisines et, jusqu'à preuve irréfutable du contraire, cette hypothèse ne doit pas être complètement écartée. Néanmoins, l'aspect cohérent du groupe, l'absence de séparation brutale entre ses différents éléments, nous font plutôt penser à la coexistence d'aggrégats moléculaires hémocyaniques différents, tels que les a révélés l'ultracentrifugation.

Mais alors que celle-ci n'a fait apparaître, jusqu'à présent, que deux composants hémocyaniques, l'électrophorèse en gélose en laisse supposer trois et nous verrons par la suite que d'autres méthodes confirment cette supposition. Il serait naturellement intéressant d'établir une correspondance éventuelle entre les constituants révélés par l'ultracentrifugation et ceux concrétisés par l'électrophorèse en gélose. Tout un travail reste aussi à faire pour savoir si les constituants décelés varient quantitativement les uns par rapport aux autres d'un individu à l'autre et, si oui, pour établir à quel déterminant physiologique

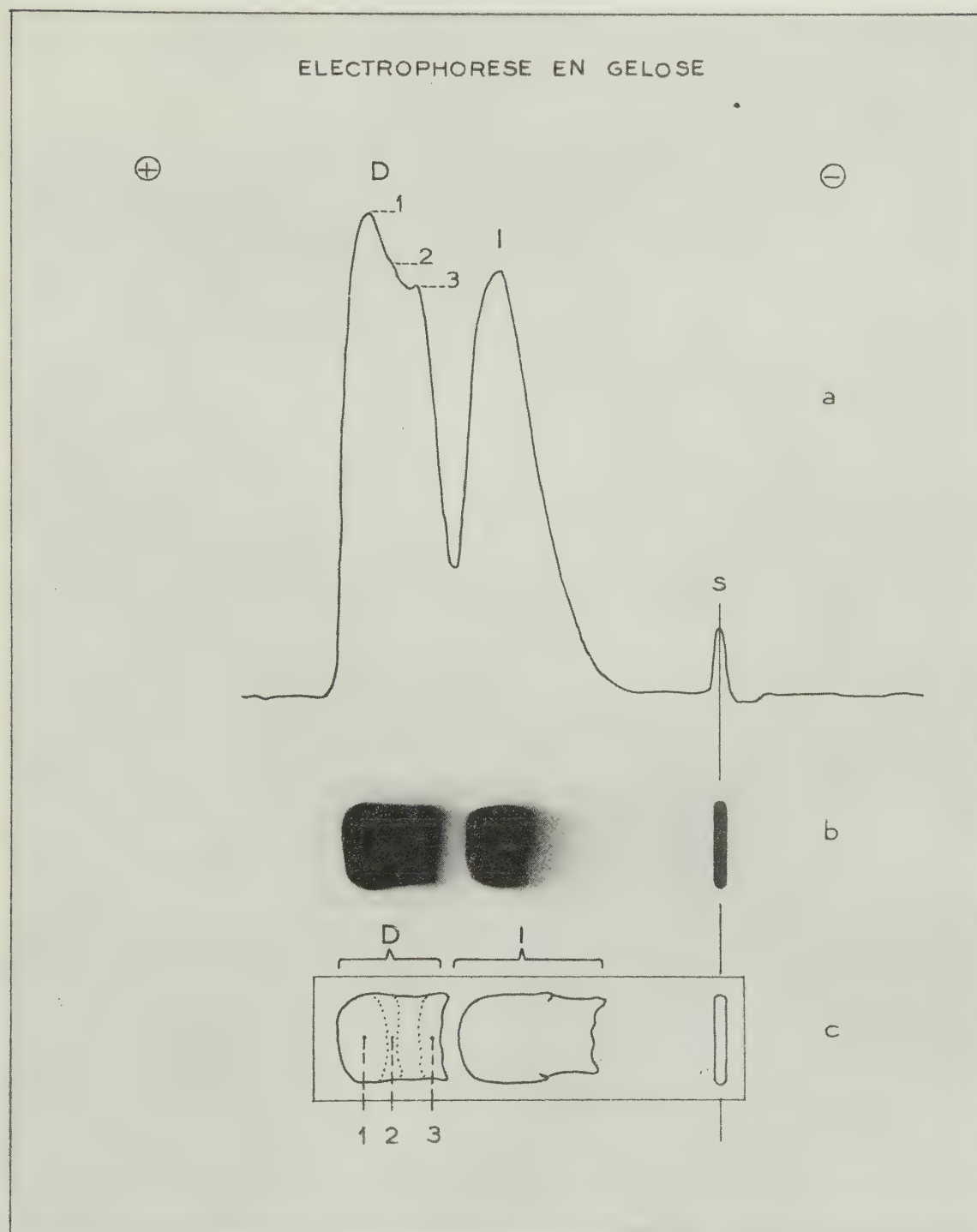


FIG. 25. — Subdivisions de la fraction distale (hémocyanine) du sérum de Crabe par électrophorèse en gélose : a) Courbe photométrique ; b) Photographie originale ; c) Schéma explicatif.

ces variations obéissent. Il serait encore d'un grand intérêt de comparer sous cet angle les hémocyanines d'espèces différentes, notamment celles d'animaux dont le composant majeur a une constante de sédimentation $S_{20} = 17$.

b) *Autres fractions protéiques.*

En dehors de l'hémocyanine et de ses sous-fractions, quels sont les autres groupes protéiques séparés en gélose ? Comme sur le papier, on rencontre en deuxième position la fraction intermédiaire. Dans les conditions expérimentales choisies, elle se situe à la hauteur de la sérumalbumine humaine, sans d'ailleurs que cette constatation autorise une interprétation autre que celle d'une identité des mobilités électrophorétiques. La tache colorée formée par cette fraction est quelquefois aussi, sinon plus importante que celle de l'hémocyanine. Nous avons remarqué qu'elle produit un effet de traînée assez net que l'on peut interpréter, soit comme un artefact expérimental — ce qui est peu probable — soit comme le signe de l'existence d'une famille de protéines de mobilités voisines. Le fait que, dans le cas de sérums différents dans lesquels cette fraction n'existe qu'à l'état de traces, on la trouve dans des positions différentes, toutes autres conditions restant inchangées, nous fait pencher en faveur de cette dernière supposition. Ne manquons pas de souligner que de telles observations ne sont guère possibles sur papier filtre et qu'il faut la finesse et la fidélité de la technique en gélose pour les rendre valables.

La coloration des glycoprotéides par l' α -naphthol a confirmé ce que le papier avait déjà appris quant à la nature de la fraction intermédiaire.

Finalement, la troisième fraction, que nous avons dénommée proximale sur le papier filtre, se retrouve elle aussi en gélose. Par rapport à la cuvette de dépôt, elle se situe en position cathodique, à un niveau intermédiaire entre les β et les γ -globulines humaines, alors qu'on se souvient que sur papier, cette position était anodique. Cette différence est due, d'une part à l'emploi en gélose d'un tampon moins basique (8,2 au lieu de 8,6) et, d'autre part, à la forte électroendosmose propre au support gélose, phénomène qui fait refluer toutes les fractions en sens inverse de leur migration électrophorétique.

La coloration au noir Soudan reste positive pour ces protéines et indique leur nature lipoprotéique (fig. 26, page 141).

En résumé, l'électrophorèse en gélose confirme l'authenticité et la nature des trois groupes protéiques antérieurement définis par électrophorèse sur papier chez *Carcinus maenas*. Elle apporte des renseignements nouveaux par la mise en évidence de trois sous-fractions dans le groupe hémocyanique et rejoint par là les résultats fournis par d'autres procédés physico-chimiques. Par sa netteté et sa constante, elle s'impose comme meilleure technique d'électrophorèse de zone pour toutes les recherches ultérieures, qualitatives et quantitatives concernant l'hémolymphe des Crustacés.

IV. — IMMUNO-ELECTROPHORESE EN GELOSE

A l'arsenal biochimique considérable déjà utilisé pour l'investigation des protéines s'est ajouté, en 1953, une technique nouvelle d'une incomparable finesse : l'immuno-électrophorèse en gélose de P. GRABAR et C.A. WILLIAMS.

Remarquable dans sa conception, cette méthode a déjà donné tant de résultats intéressants dans les quelques années de son développement et en promet encore tant d'autres dans des domaines où elle commence seulement à s'exercer, qu'elle mérite d'être décrite en détail, et dans sa genèse et dans son mode opératoire.

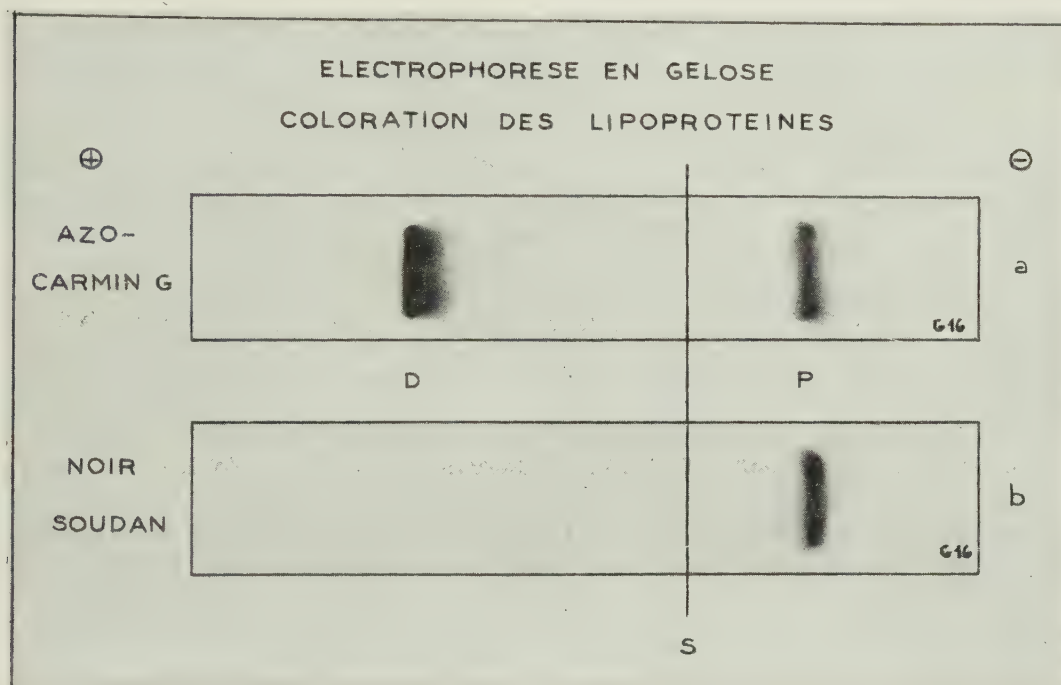


FIG. 26. — Mise en évidence des lipoprotéines d'un sérum de Crabe ♀ après électrophorèse en gélose : a) Coloration générale des protéines par l'azocarmin G ; b) Coloration élective des lipoprotéines par le noir Soudan.

A. — Genèse.

L'immuno-électrophorèse représente l'aboutissement de plusieurs étapes de recherches dans une voie déterminée. Pour comprendre sa genèse, le rappel de quelques notions immunologiques fondamentales s'impose.

Le terme d'antigène s'applique à toute substance qui, introduite dans un organisme vivant, provoque chez celui-ci la formation d'anticorps. Par voie de retour, un anticorps est une substance qui prend naissance dans l'organisme d'un animal ayant reçu un antigène. Mis en présence l'un de l'autre, antigène et anticorps réagissent de façon spécifique en donnant lieu à des manifestations physico-chimiques variées telles que l'agglutination ou la précipitation. Ces réactions, dites immunologiques, sont remarquables par leur spécificité et leur extrême sensibilité. Grâce à elles, on peut détecter des quantités infinitésimales de substances. La moindre variation de structure de l'antigène entraîne, en général, une variation concomitante de celle de l'anticorps, si bien que la substance-mère ne réagit qu'avec la substance-fille et que l'une permet ainsi de détecter l'autre avec la plus grande précision.

Ces phénomènes sont connus de longue date, mais ce n'est que par les travaux quantitatifs de HEIDELBERGER et de son école qu'ils ont trouvé des applications pratiques, créant une nouvelle science : l'immuno-chimie.

1. *Technique d'oudin.*

Dans le domaine particulier qui nous occupe, un premier progrès a été réalisé par J. OUDIN (1946) qui a mis au point une technique en tube permettant de distinguer dans la réaction de précipitation totale l'individualité de certains couples antigène-anticorps. Il suffit pour cela d'incorporer l'antisérum à un gel de gélose déposé au fond d'un tube à lumière fine et de superposer à ce mélange une solution convenable de l'antigène. Ce dernier diffuse lentement au travers de la gélose et y rencontre l'anticorps avec lequel il précipite dans une zone très limitée de concentration favorable. Ce précipité devient visible sous forme d'un disque ou d'une bande opaque. Dans le cas de plusieurs couples antigène-anticorps différents, la vitesse de diffusion n'est pas obligatoirement la même pour chacun d'eux, les zones optima de concentration ne se superposent pas forcément et plusieurs anneaux de précipitation peuvent apparaître. Leur multiplicité matérialise la multiplicité des couples antigène-anticorps. Elle offre une possibilité de les dénombrer. Il faut cependant remarquer qu'un même anneau peut représenter plusieurs couples dont la précipitation s'est faite à un même niveau.

Cette technique a trouvé de nombreuses applications dans les recherches biologiques. Citons, entre autres, les travaux de W. H. TELFER (1954) qui ont mis en évidence chez la femelle de *Platysmia cecropia* un septième antigène n'existant chez le mâle qu'en quantité négligeable.

2. *Technique d'Ouchterlony.*

A la méthode d'oudin s'est ajoutée, en 1948, une variante fort intéressante mise au point par O. OUCHTERLONY. Elle consiste à couler dans une boîte de Pétri une couche de gélose de 3 ou 4 mm d'épaisseur pour y découper à l'emporte-pièce deux cuvettes circulaires convenablement espacées. L'une d'elles est remplie d'une solution d'antigène et l'autre d'une solution de l'anticorps correspondant. Au cours d'un séjour de un ou deux jours en chambre humide, les deux solutions diffusent spontanément l'une vers l'autre au travers de la gélose. Dans la zone où antigènes et anticorps se rencontrent dans des proportions convenables, il y a formation d'une ligne de précipitation visible par transparence. Dans le cas de plusieurs antigènes et de plusieurs anticorps, il peut se former des lignes distinctes correspondant aux divers couples.

Cette méthode offre de nombreuses possibilités. Ainsi, en réalisant une cuvette centrale pour un antigène A et en l'entourant de plusieurs cuvettes équidistantes qui recevront des solutions de composition inconnue, on pourra déceler la présence de l'anticorps anti-A dans l'une ou l'autre de ces solutions. L'opération inverse peut se faire suivant le même principe. On peut aussi rechercher de la sorte les conditions de concentration les plus favorables pour une bonne précipitation.

De plus, OUCHTERLONY a élaboré un système qui permet de reconnaître si deux antigènes trouvés dans deux solutions différentes sont identiques, différents ou immunologiquement voisins. La figure 27 (page 143) schématise le principe de ce procédé. Lorsque les deux antigènes sont identiques, les deux lignes de précipitation confluent en un trait

continu : c'est la réaction d'identité. Lorsqu'ils sont différents, les deux lignes se croisent très nettement : c'est la réaction indépendante. Lorsque enfin ils sont voisins et portent certains motifs antigéniques semblables, les lignes de précipitation confluent d'abord, puis l'une d'elles se poursuit indépendamment. On a alors une réaction croisée. Ce perfectionnement est susceptible de fournir des renseignements sur la parenté immunologique de substances biologiques.

C'est à partir des techniques d'ODJIN et d'OUCHTERLONY qu'a pu être élaborée l'immuno-électrophorèse dont le principe va maintenant être exposé.

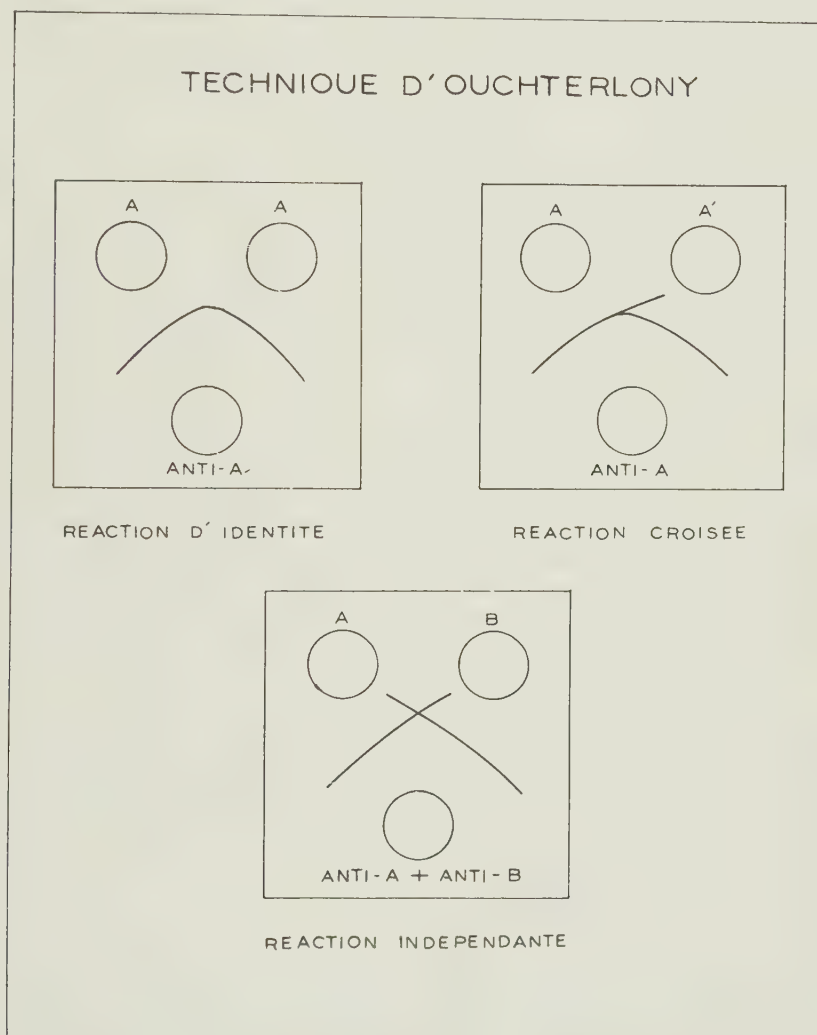


FIG. 27. — Possibilités analytiques de la technique d'OUCHTERLONY.

B. — Principe.

L'immense mérite de P. GRABAR et C. A. WILLIAMS a été de combiner en une synthèse heureuse les possibilités de l'électrophorèse simple et celles de la méthode d'OUCHTERLONY. Partant de l'affirmation que la preuve de l'homogénéité d'une substance n'est pas toujours

fournie par l'examen d'un seul critère, mais qu'elle devient plus certaine lorsque plusieurs critères utilisés donnent des résultats concordants, ces auteurs ont associé dans une même technique mobilité électrophorétique et spécificité immunologique.

Pour cela, il est d'abord procédé à une électrophorèse simple en gélose du mélange à étudier. Lorsque la séparation électrophorétique est jugée suffisante, on dépose dans une cuvette allongée et parallèle à l'axe de migration, un antisérum qui renferme les anticorps relatifs aux antigènes déjà séparés du mélange. La diffusion des antigènes et des anticorps se fait ensuite spontanément comme dans des plaques d'OUCHTERLONY et leur rencontre dans des zones de concentration favorable donne des lignes de précipitation. L'aspect de ces lignes est conditionné par la forme des cuvettes antigène et anticorps. Comme la progression des anticorps est strictement linéaire, sauf aux extrémités de la cuvette, que celle des antigènes s'effectue à partir de plages plus ou moins arrondies, les précipités prennent la forme d'arcs plus ou moins ouverts dont le sommet se situe à la hauteur du maximum de concentration de la plage d'antigène.

Lorsqu'une même fraction électrophorétique renferme plusieurs antigènes dont les mobilités sont identiques, mais les vitesses de diffusion ou les concentrations différentes — ce qui est également possible pour les anticorps — on observe plusieurs arcs concentriques. Par contre, lorsqu'un même groupe électrophorétique contient plusieurs antigènes de mobilités voisines, les arcs formés sont décalés l'un par rapport à l'autre dans le sens de l'axe de migration et leurs branches peuvent se croiser suivant le type de la réaction indépendante.

On conçoit immédiatement la puissance analytique considérable qui résulte du jeu subtil de ces facteurs et comment elle permet de démasquer nombre de constituants que ne met pas en évidence le pouvoir séparateur plus limité de l'électrophorèse classique ou des méthodes d'ODUDIN et d'OUCHTERLONY. Cette puissance est amplement démontrée par les résultats acquis en sérologie humaine où, à ce jour, au lieu des cinq fractions dénombrées jusqu'alors, l'immuno-électrophorèse permet d'en compter une trentaine.

Ce n'est pas le moindre mérite des auteurs et de leurs collaborateurs d'avoir parfaitement mis au point les modalités techniques de la méthode et d'en avoir assuré la diffusion.

Les brillants résultats obtenus pour le sérum humain nous ont suggéré que cette technique pourrait être aussi féconde dans le domaine plus modeste, mais non moins intéressant des Invertébrés. Aussi nous sommes-nous attaché à l'appliquer à l'étude du sérum de *Carcinus maenas*.

C. — Application au sérum de *Carcinus maenas*.

L'opération préliminaire indispensable à tout travail de ce genre consiste à préparer des antisérums relatifs au liquide biologique étudié. C'est d'elle que nous allons traiter à présent.

1. Préparation des immunsérums.

L'une des plus grandes difficultés des études immunologiques réside dans la variabilité des réponses de plusieurs animaux de la même espèce à un traitement immunisant unique. Certains individus réagissent de façon vigoureuse en formant des anticorps nombreux et abondants, alors que d'autres, pour des raisons inconnues, n'en fabriquent pas.

Il serait donc fallacieux de fonder des conclusions sur l'emploi d'un immunosérum fourni par un seul individu et il est nécessaire, pour un mélange donné d'antigènes, d'immuniser plusieurs animaux à la fois, afin de les comparer et de sélectionner les liquides les plus riches.

C'est ce qui a été fait pour le sérum de Crabe.

Le Lapin a été choisi comme animal producteur d'anticorps, car il est peu onéreux, d'élevage facile et à réaction satisfaisante.

Nos sujets, d'un poids de 2 kilogrammes environ, ont été immunisés par injection, dans la veine marginale de l'oreille de quantités croissantes d'hémolymph de Crabe centrifugée. Pour faciliter ces opérations et immobiliser les Lapins, nous avons construit une caissette en bois (fig. 28, ci-contre) munie d'un double plancher et d'une double paroi mobiles, artifice qui permet d'adapter le récipient à la taille de chaque individu. Les injections ont été rendues plus aisées en épilant la zone marginale de l'oreille et en gonflant la veine visée par friction au toluène. Elles ont été faites avec des seringues de précision de 1 ml du type « insuline », armées d'aiguilles de 0,6 mm et soigneusement stérilisées. En moyenne, elles ont été répétées tous les deux jours et se sont étalées sur trois semaines environ. Les trois premières injections ont comporté des doses de 0,2 ml ; les quatre suivantes ont été doublées ; les dernières se sont élevées à 0,5 ml.

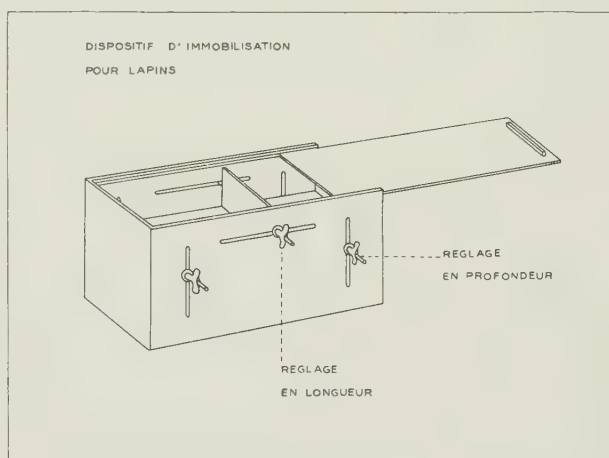


FIG. 28. — Dispositif d'immobilisation des Lapins pendant les injections. Dimensions adaptables à la taille de l'animal.

Les Lapins ont bien résisté à ce traitement, à l'exception d'un seul qui a succombé dès la deuxième injection. Toutefois, son état général était déficient et, à l'autopsie, il s'est trouvé être porteur de parasites.

Deux semaines après la dernière injection — laps de temps que l'on estime généralement nécessaire à la production d'une quantité suffisante d'anticorps — tous les animaux ont été sacrifiés et leur sang recueilli dans de grands tubes à essai stériles. Au bout de vingt-quatre heures, après formation spontanée du caillot, le sérum prélevé par décantation a été mis en ampoules scellées de 5 ml, après addition d'une goutte de merthiolate. Ces ampoules ont été conservées à $+4^{\circ}\text{C}$.

Un premier objectif consistant à rechercher l'existence d'éventuelles différences immunologiques entre les sérums des Crabes ♂ et ♀ normaux, un lot de 5 Lapins (groupe I) a été traité avec du sérum de Crabes ♂ indemnes et un lot de 4 Lapins (groupe II) avec du sérum de femelles indemnes. De même, pour saisir une particularité éventuelle des Crabes sacculinés, 4 Lapins (groupe III) ont été immunisés avec du sérum de mâles parasités et un Lapin (groupe IV) avec du sérum de femelles sacculinées. A titre expéri-

mental et comparitif, un Lapin (groupe V) a aussi été traité avec du sérum humain normal. L'unique animal n'ayant pas résisté aux injections appartenait au groupe II.

Signalons que les différents Lapins, bien que de tailles et de poids très voisins, ont donné des volumes de sang très inégaux. Certains de ces sangs avaient une tendance marquée à l'hémolyse.

2. Etude comparative des immunosérums.

a) Technique.

Les divers antisérums ont été comparés du point de vue de leur richesse en anticorps par application de la méthode d'OUCHTERLONY dans une modification voisine de celle préconisée par M. KAMINSKI (1954).

Des plaques de 50×50 mm sont recouvertes d'une couche de 3 à 4 mm de gélose tamponnée pour électrophorèse. La préparation de telles plaques est fort simple lorsqu'on adopte le dispositif suivant. Sur une plaque de verre surélevée par des pieds, on encadre le nombre désiré de plaques pour diapositives par des règles métalliques à section carrée, coupées à la longueur désirée. Celles-ci sont maintenues adhérentes au support par de forts bracelets de caoutchouc. Dans ce moule réglable facile à mettre en place et à démonter, il suffit de couler la quantité de gélose calculée en fonction de l'épaisseur désirée, de laisser refroidir et de découper les plaques suivant leur périmètre. Pour faciliter la manipulation des plaques et leur conserver des bords nets, nous conseillons d'amputer chaque côté du carré de 3 ou 4 mm de gélose.

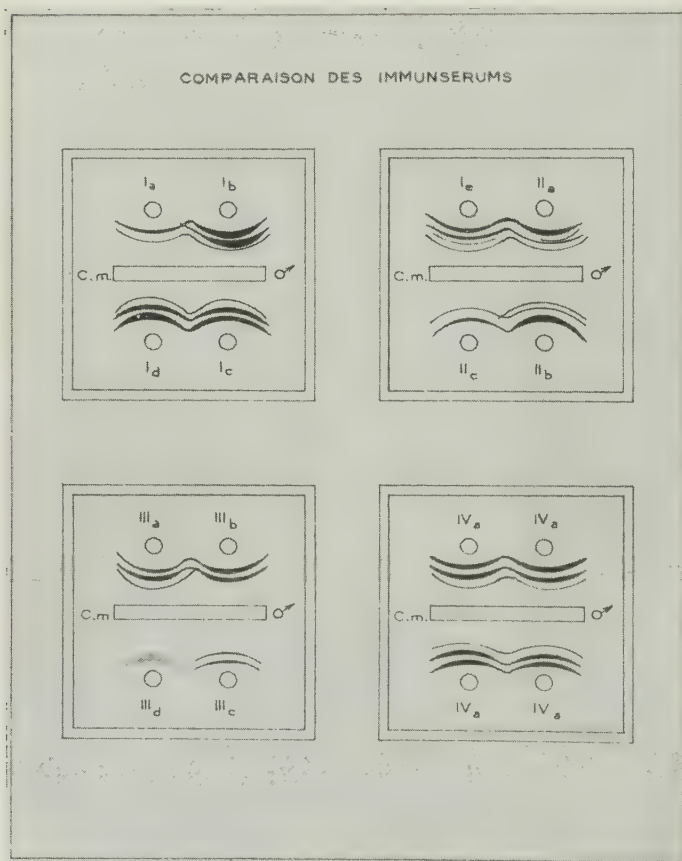


FIG. 29. — Différences révélées par la technique d'OUCHTERLONY entre les immunosérums de 13 Lapins ayant reçu des injections de sérum de Crabe.

Un autre procédé consiste à placer les plaques de verre sur le plateau de la cuve à usages multiples, à les encadrer par les règles d'arrêt calées par des plombs, à faire les joints d'étanchéité et à couler la gélose. La prise du gel est ici plus rapide par suite du système de refroidissement.

Pour réaliser les différentes cavités devant recevoir sérums et antisérums, on place la plaque sur un carré de bristol blanc de mêmes dimensions, lequel porte le dessin de la disposition désirée. Dans de nombreux cas, nous avons adopté le schéma représenté par la figure 29 (page 146).

La cuvette longitudinale peut se découper de façon très régulière avec deux lames de rasoir réduites à 30 mm de longueur et fixées parallèlement dans un bloc de plexiglas à 3 mm l'une de l'autre. La gélose est enlevée avec une petite spatule courbe faite à partir d'une aiguille emmanchée. Les cuvettes circulaires sont obtenues par le procédé décrit pour la microélectrophorèse en gélose. Sérums et antisérums se déposent avec des micropipettes très fines calibrées au mercure.

Après pulvérisation avec une solution de merthiolate à 1 %, les plaques séjournent en chambre humide. Etant donné les dimensions réduites adoptées, les lignes de précipitation apparaissent rapidement et lecture peut en être faite au bout de 24 ou 48 heures. Lorsqu'on désire conserver des documents relatifs à l'évolution progressive des précipités, il est possible de photographier les plaques en cours de diffusion; par contact, en chambre noire, sous eau physiologique.

Pour l'obtention d'un document coloré définitif, lorsque la diffusion est achevée, chaque plaque est d'abord lavée pendant trois jours dans une eau physiologique renouvelée deux fois par jour, qui élimine les protéines n'ayant pas réagi; on sèche ensuite et on colore comme pour une électrophorèse en gélose ordinaire. L'azocarmin G donne ici les meilleures définitions.

b) *Résultats.*

Tous les immunsérums ont été éprouvés en les faisant réagir contre un sérum de Crabe ♂ indemne chez lequel une électrophorèse préalable avait révélé des fractions distale et intermédiaire considérables. Celui-ci est déposé dans la cuvette longitudinale, alors que les cuvettes circulaires reçoivent les antisérums. La rapidité d'apparition, la vitesse d'accroissement et l'importance finale des arcs de précipitation qui se forment donnent une idée approximative de la richesse relative des antisérums en anticorps.

Dans le groupe I (mâles indemnes), les sérums I b, I c et I d se sont révélés les plus riches, alors que I a et I e réagissent plus faiblement. Dans le groupe II (femelles indemnes), les immunsérums II a et II b paraissent bien réactifs, alors II c l'est moins. Le groupe III (mâles sacculinés) donne deux réponses moyennes (III a et III b), une réponse faible (III c) et une réaction pratiquement nulle. Le sérum IV (femelles sacculinées) révèle une teneur moyenne en anticorps.

Les différences constatées ne sont d'ailleurs pas seulement d'ordre quantitatif. Le nombre des lignes de précipitation varie d'un antisérum à l'autre, ainsi que le montre nettement le schéma de la figure 29 (page 146). On peut y constater que l'antisérum I e engendre quatre arcs, alors que I a n'en produit que deux, ce qui indique des différences quantitatives entre les deux liquides.

Ces épreuves préliminaires confirment bien l'observation souvent répétée en immunologie selon laquelle différents individus répondent très inégalement à un même stimulus immunisant.

Des essais de dilution des antisérums ont aussi été faits afin de rechercher la concentration optima pour l'obtention des meilleures figures de précipitation, car on sait que la réaction antigène - anticorps ne devient décelable que dans une zone définie de concentrations, dite zone d'équivalence. En partant de l'un des antisérums les plus riches (I c), qui est dilué de moitié, puis au tiers et au quart dans l'eau physiologique, on peut constater, comme le montre la figure 30 a (page 149), que :

— la netteté des lignes de précipitation diminue avec la concentration de l'immunsérum ;

— lorsque cette concentration diminue, les arcs se rapprochent de la cuvette anti-sérum ;

— c'est l'immunsérum non dilué qui donne en définitive les meilleurs résultats. C'est avec lui que les arcs sont les plus nets et le mieux répartis dans l'espace séparant la cuvette sérum de la cuvette antisérum.

En conséquence, tous les essais ultérieurs ont été faits avec des immunsérums non dilués.

La question s'est aussi posée de savoir si le rendement des moins riches d'entre eux pouvait être amélioré par une concentration préalable. Une telle concentration a été réalisée par pervaporation de la manière suivante :

3 ml d'antisérum sont introduits dans un manchon de cellophane dont une extrémité est serrée dans un cadre métallique supporté par une tige qui fait office d'axe de rotation (1). L'ouverture libre du manchon est, à son tour, serrée dans le cadre, et la tige axiale rendue solidaire de l'arbre d'un agitateur électrique tournant à 100 t/minute environ. L'ensemble est placé dans le souffle d'un ventilateur et, après 1 h. 30 de rotation, grâce au courant d'air, à l'importance de la surface de contact, à l'agitation créée au sein du liquide et à la minceur de celui-ci, on peut constater que le volume initial est à peu près réduit au tiers sans qu'aucune précipitation des protéines ne soit enregistrée. Dans nos essais, seuls les immunsérums ont été traités de la sorte, mais il est évident que les sérums de Crabes peuvent l'être de la même façon, en particulier ceux des animaux venant de muer.

La figure 30 b (page 149) montre côte à côte les résultats obtenus avec l'antisérum II c avant et après concentration.

Signalons enfin qu'à titre démonstratif, nous avons aussi testé l'antisérum antihumain. Comme on pouvait s'y attendre, sa rencontre dans la gélose avec le sérum de Crabe n'a donné lieu à aucun précipité. L'essai inverse a été tout aussi probant, car aucun des immunsérums de Lapin anticrabe n'a réagi avec du sérum humain. Ces expériences montrent, une fois de plus, la spécificité rigoureuse des réactions immunologiques.

3. Immuno-électrophorèses.

a) Technique.

Toutes les immuno-électrophorèses ont été réalisées suivant la technique originale de P. GRABAR et C. A. WILLIAMS, adaptée à la cuve à usages multiples et au sérum de *Carcinus maenas*.

(1) Dispositif aimablement fourni par le Docteur M. VERAÏN.

La séparation des antigènes du sérum de Crabe est obtenue par une électrophorèse simple en gélose telle qu'elle a déjà été décrite. Celle-ci se fait dans une plaque de 180×50 mm dans laquelle on a soin de découper la cuvette de dépôt à 8 mm du bord longitudinal et à 60 mm du bord cathodique. L'emporte-pièce, utilisé à cet effet, doit être un peu plus gros que celui qui sert pour les électrophorèses simples. Pour la dilution du sérum déposé, les proportions déjà indiquées (0,5 ml de gélose + 0,3 ml d'eau distillée + 0,2 ml de sérum) donnent de bons résultats lorsque les échantillons ont un taux protéique moyen. Mais il convient de les modifier chaque fois qu'une analyse préliminaire a révélé des taux très faibles ou très forts. Dans certains cas, on peut ajouter directement 0,5 cc de sérum à un même volume de gélose.

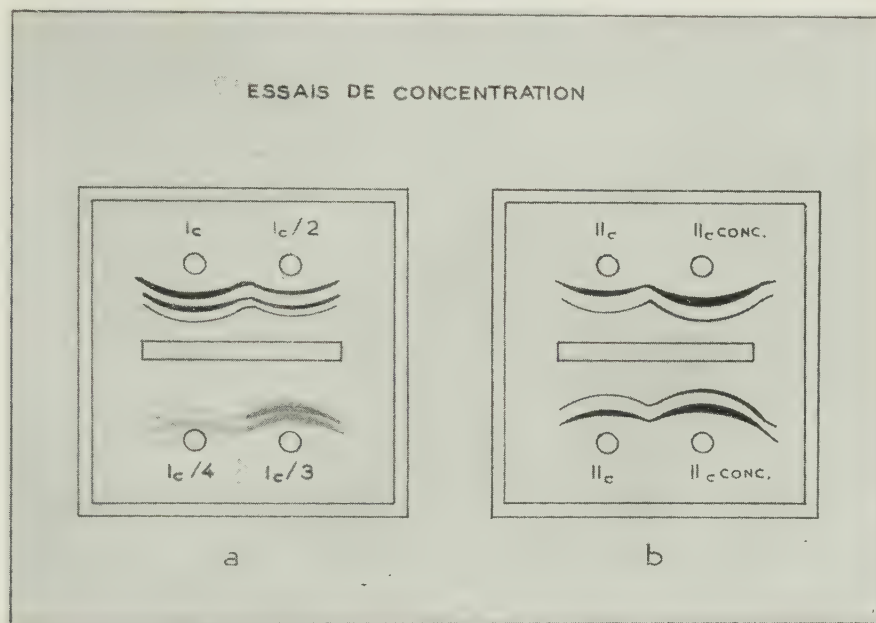


FIG. 30. — a) Recherche de la concentration optima de l'immunsérum pour une précipitation en gélose ; b) comparaison des réactions obtenues avec un antisérum d'origine et un antisérum concentré par pervaporation.

Quatre heures de passage d'un courant de 100 volts donnent une séparation suffisante.

Après ce délai, parallèlement à l'axe de migration et à 8 mm du bord de la cuvette de dépôt, on découpe dans le gel une cuvette longitudinale de 3×120 mm. Cette longueur doit se répartir, par rapport à la ligne de départ, sur 80 mm du côté anodique et 40 mm du côté cathodique. Dans la cuvette on coule 1 ml d'antisérum, puis on pulvérise l'ensemble de la plaque avec une solution de merthiolate à 1 % et on la laisse séjourner en chambre humide à température ambiante. Au bout de vingt-quatre heures, les premiers arcs de précipitation apparaissent. Leur accroissement et leur évolution peuvent être suivis pendant huit jours, mais en général, après trois jours, la majeure partie des précipités sont déjà bien visibles.

Pour les opérations ultérieures de lavage, séchage, coloration, photographie, on procède comme il a été indiqué pour les plaques-test des immunsérums.

b) Résultats.

Une première série d'essais réalise l'immuno-électrophorèse de deux sérums de Crabes normaux A et B dont la composition protéique est déjà connue par électrophorèse sur papier.

Le sérum A provient d'un mâle normal de 40 mm en C₄. Il est légèrement rose et comporte une distale et une intermédiaire moyenne.

Le sérum B est fourni par un mâle de même taille, lui aussi indemne et en C₄. Sa coloration est d'un rose plus prononcé, mais son protéinogramme ne comporte que la seule distale.

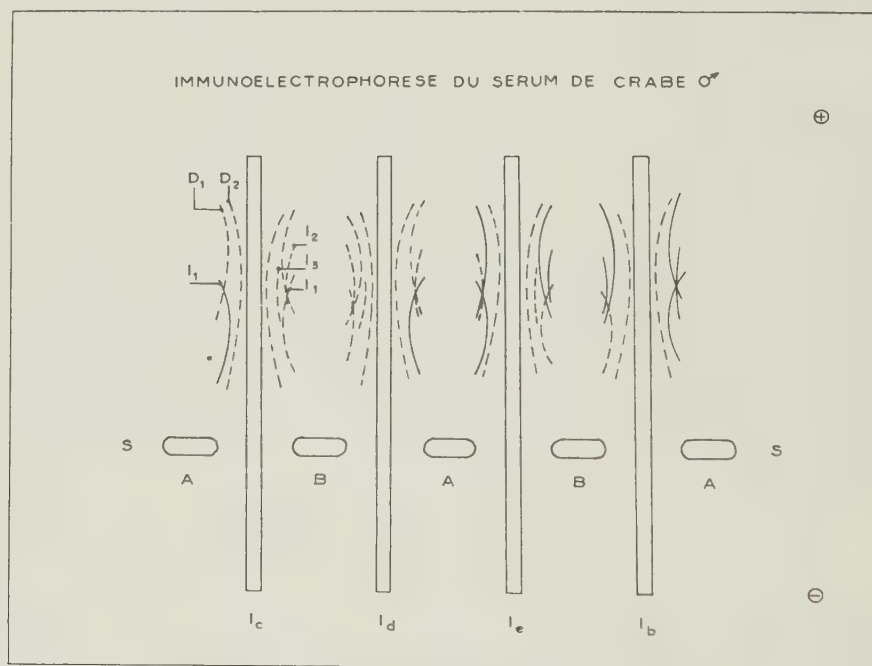


FIG. 31. — Immuno-électrophorèses en gélose de deux sérums de Crabes ♂ normaux A et B, révélées par quatre immunsérums de Lapins anticrabes normaux.

Comme antisérums sont employés les quatre sérums anticrabe ♂ normal I_c, I_d, I_e et I_b. Les positions respectives des sérums et antisérums sont illustrées par la figure 31 ci-dessus. Une telle répartition, réalisable sur une grande plaque de 180 × 240 mm, permet de révéler deux sérums différents avec un seul échantillon d'immunsérum, ce qui représente une économie de ce produit. La diffusion s'est poursuivie pendant six jours.

L'examen de la figure 31 montre que :

— les sérums de Crabes A et B donnent, avec les quatre immunsérums employés, deux arcs de précipitation au niveau de la tache distale. Celle-ci renferme donc au moins deux protéines immunologiquement différentes ;

— les deux arcs observés n'ont pas le même aspect : celui qui est le plus proche des antigènes (D_1) est toujours plus court et plus incurvé que le second (D_2), lequel s'étend plus loin vers la cathode. Cette particularité indique que D_2 représente une famille immunologique de protéines dont les vitesses de migration sont plus étalées que celles des protéines concrétisées par le premier arc ;

— l'arc Γ_2 reste flou dans tous les cas alors que D_1 est fin et net avec les antisérums I e et I b. Ce fait montre que tous les immunsérums n'ont pas la même teneur en anticorps relatifs aux antigènes précipités en D_1 et, qu'à ce point de vue, les immunsérums I e et I b sont les plus riches. On est, en effet, en droit de penser que cette différence est bien due aux antisérums puisqu'elle se manifeste indifféremment avec les deux sérums de Crabe ;

— les sérums A et B forment, dans tous les cas, un arc de précipitation (I_1) au niveau des protéines intermédiaires. Celles-ci sont donc également antigéniques et les anticorps qui leur correspondent se retrouvent dans chacun des quatre immunsérums expérimentés ;

— l'intensité de cette ligne est beaucoup plus marquée pour le sérum A que pour le sérum B, ceci avec chacun des immunsérums. Une telle observation va dans le sens des données de l'électrophorèse sur papier qui a révélé une intermédiaire moyenne pour A et son absence en B. Elle souligne, en plus, l'extrême sensibilité de la technique immuno-électrophorétique qui met en évidence des quantités très faibles d'antigènes, lesquelles passent inaperçues sur papier ;

— avec le sérum de Crabe B diffusant contre les immunsérums I c, I d et I e, on obtient deux arcs supplémentaires plus discrets, en position intermédiaire entre les deux groupes décrits précédemment. Celui de ces arcs qui est le plus proche de l'axe de migration électrophorétique (I_2) a une position légèrement plus anodique que son voisin (I_3) et correspond donc à des protéines un peu plus rapides. Il vient croiser nettement l'arc I_1 montrant ainsi qu'il s'agit de protéines immunologiquement différentes. Le second arc (I_3), un peu plus cathodique, se situe entre les extrémités de D_1 et D_2 . Les deux nouvelles protéines ainsi matérialisées sont propres au sérum B et leurs anticorps communs aux immunsérums I c, I d et I e. Notons que I e semble plus riche en ceux des anticorps qui donnent naissance à l'arc I_2 . L'immunsérum I b renferme aussi ces derniers, mais non ceux qui contribuent à former l'arc I_3 ;

— avec le sérum A, les immunsérums I d et I e donnent également l'arc I_2 , à l'exclusion de son voisin. L'antisérum I b donne, de plus, un arc très net dont le sommet coïncide avec l'intersection de D_1 et I_1 . Il est difficile de préciser pour l'instant si cette ligne correspond à une protéine supplémentaire ou si elle représente, sous une forme accentuée, le plus voisin des antigènes des deux précipités précédemment décrits.

Ces essais montrent donc que le sérum de Crabe ♂ normal renferme au moins 5 antigènes protéiques différents. Les deux premiers correspondent à la fraction distale que nous savons renfermer l'hémocyanine. S'agit-il de deux protéines de nature hémocyanique ou

l'une d'elles seule a-t-elle droit à cette qualification ? En l'état actuel de nos connaissances, une réponse définitive ne peut être donnée. Il semble cependant que les deux arcs observés correspondent bien à deux des subdivisions de la distale observées en électrophorèse simple en gélose. Comme la plus rapide de ces sous-fractions est aussi quantitativement la plus importante et qu'il est à peu près sûr qu'elle corresponde à l'hémocyanine proprement dite, en immuno-électrophorèse cette dernière serait donc représentée par l'arc D_1 . Cette supposition est fortement étayée par le fait que, dans certaines immuno-électrophorèses, D_1 est plus net et marqué que D_2 , se situe plus près de l'origine des antigènes et présente une migration plus anodique. A titre d'hypothèse de travail, on peut penser que D_2 représente une fraction hémocyanique de poids moléculaire plus faible qui diffuse plus rapidement dans la gélose et forme un précipité plus proche de la cuvette des anticorps.

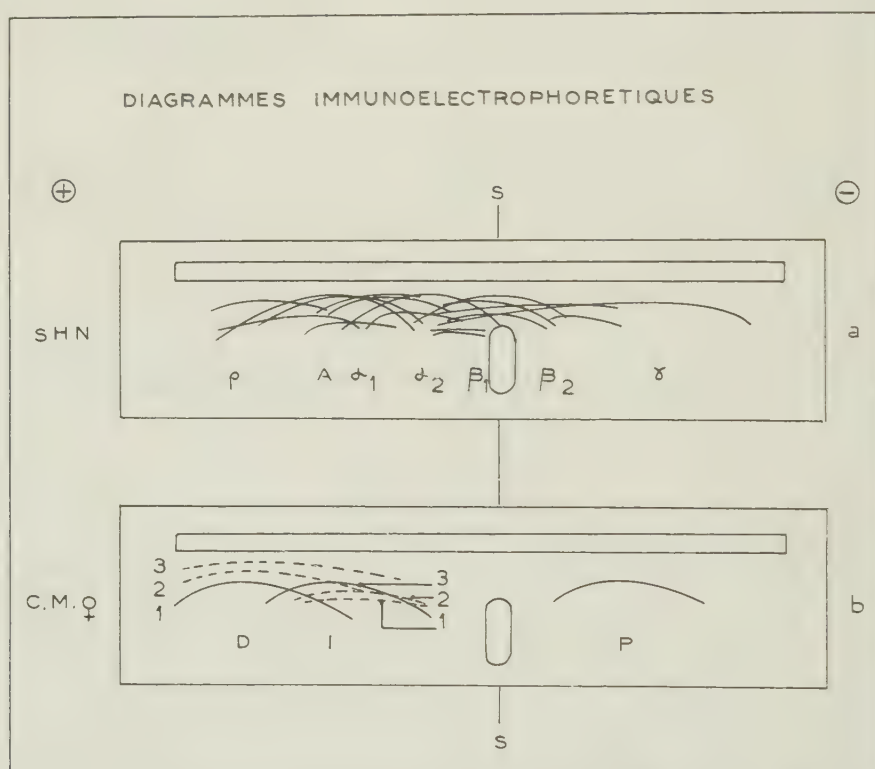


FIG. 32. — Comparaison des diagrammes immunoélectrophorétiques d'un sérum humain et d'un sérum de Crabe ♀. a) Sérum humain normal ; b) Sérum de Crabe ♀.

Ajoutons à ce propos, sans entrer dans le détail de toutes les autres immuno-électrophorèses réalisées, que certaines d'entre elles ont mis en évidence, au niveau des protéines distales, un troisième arc allongé et flou qui sera dénommé D_3 . Cet arc ne se produit qu'avec certains sérums de Crabes et certains immunosérums seulement (II a, III b, III c, IV a). Il semble dû à des protéines existant chez certains Crabes seulement et dont les anticorps n'ont été formés que par les Lapins ayant reçu de tels sérums. La présence

inconstante de cette troisième sous-fraction distale concorde bien avec les résultats de l'électrophorèse simple en gélose qui a montré que la tache distale est tantôt subdivisée en deux bandes, tantôt en trois.

En ce qui concerne la nature des autres lignes de précipitation observées, il est encore difficile de se prononcer. L'arc I_1 correspond de toute évidence aux protéines de la fraction intermédiaire. Il est plus difficile de juger si les deux arcs mineurs situés entre le groupe hémocyanique et celui des glycoprotéides sont dus à des antigènes de l'une ou l'autre catégorie. Cependant, dans certaines expériences réalisées dans des conditions techniques un peu différentes, ces arcs se forment nettement sous la ligne de précipitation I_3 , ce qui tend à montrer que les antigènes correspondants font partie de ce groupe.

L'étude du sérum de Crabes ♀ indemnes à l'aide des immunsérums anticrabes ♀ a donné des figures semblables à celles obtenues avec les mâles. Les arcs formés ont le même aspect et la même localisation. Dans le cas des sérums renfermant des protéines proximales, un nouvel arc de précipitation apparaît en position cathodique (fig. 32, page 152). Il représente la seule différence immunologique enregistrée entre les deux sexes.

L'immuno-électrophorèse du sérum de Crabes sacculinés des deux sexes n'a pas apporté d'éléments nouveaux aux diagrammes antérieurs. Dans certains cas, les lignes de précipitation sont plus floues qu'avec les sérums normaux, mais ceci se comprend fort bien quand on sait que très souvent le taux des protéines est très affaibli chez les Crabes sacculinés. Quelques analyses ont révélé des altérations de la forme des arcs. Nous avons d'abord pensé que ces particularités pouvaient être l'expression de l'altération de certaines protéines (R. FRENTZ, A. VEILLET, 1958). Des vérifications ultérieures ont montré qu'elles sont en réalité imputables à des conditions techniques, les analyses en question ayant été réalisées en chambre refroidie à $+5^\circ\text{C}$. Pour l'instant, il ne semble donc pas que la présence de la Sacculine provoque chez l'hôte la formation de protéines nouvelles ou l'altération de protéines existantes, immunologiquement décelables.

D. — Conclusions.

Toutes ces données peuvent être résumées par le diagramme que reproduit la figure 32 (page 152) où se trouvent comparées l'immuno-électrophorèse d'un sérum de Crabe ♀ révélé par un sérum de Lapin anticrabe ♀ et celle d'un sérum humain normal révélé par le sérum équin antihumain de l'Institut Pasteur. Il apparaît de suite que la composition protéique du sérum de Crabe est beaucoup plus simple, du point de vue immunologique, que celle du sérum humain. Six protéines distinctes peuvent y être dénombrées avec certitude. Trois se situent au niveau de la fraction distale et sont dénommées D_1 , D_2 et D_3 en partant de la source d'antigènes. Trois autres correspondent à la fraction intermédiaire et sont désignées par I_1 , I_2 , I_3 . Une dernière famille immunologique est constituée par la fraction P de nature lipoprotéique.

A la place des trois groupes de protéines que permettait de déceler avec certitude l'électrophorèse sur papier, l'immuno-électrophorèse en dénombre ainsi sept. Ce chiffre n'est sans doute pas définitif. Il est possible qu'en hyperimmunisant les Lapins plus longtemps, qu'en employant des antigènes purifiés au préalable, qu'en ayant recours, pour les injections, à des substances adjuvantes ou même en s'adressant à des receveurs plus réactifs, on augmente encore la quantité des arcs de précipitation.

Quoi qu'il en soit, les essais déjà réalisés mettent en lumière tout l'intérêt que peut présenter, par sa puissance d'analyse, la technique immuno-électrophorétique dans les études biologiques. Par elle, des quantités infimes de protéines peuvent être inventoriées chez de tout petits animaux. Mais au-delà de ce recensement, il sera encore possible d'établir la parenté de certaines de ces substances, de remonter aux organes qui les synthétisent ou de les suivre dans les étapes de leurs transformations. Ici encore, les résultats déjà acquis ne sont qu'un encouragement prometteur pour le travail qui reste à accomplir.

V. — ELECTROPHORESE EN GEL D'AMIDON

A. — Introduction.

En 1955, O. SMITHIES a élaboré une technique d'électrophorèse en gel d'amidon qui a fourni des résultats nouveaux et intéressants en sérologie humaine.

Elle utilise comme support un gel d'amidon préparé dans des conditions très précises et coulé en plaques épaisses à la manière de la gélose. Ce nouveau substrat se caractérise par des pores extrêmement fins que l'on suppose d'un calibre voisin de la taille des molécules protéiques. Celles-ci subissent alors dans leur migration une sorte d'effet filtrant qui ajoute son pouvoir sélectif à celui des différences de charges électriques. Des fractions ignorées peuvent ainsi être mises en évidence.

Dans le sérum humain par exemple, O. SMITHIES (1955) d'abord, J. MORETTI, G. BOUS-SIER et M. F. JAYLE (1957) ensuite, sont arrivés à distinguer une douzaine de constituants différents, nombre qui s'est même élevé à 18-19 par la suite. De plus, des analyses en séries ont permis de révéler des différences héréditaires dans les constituants sériques de l'Homme et de certains Vertébrés (Cheval, Porc, Chien Bœuf).

Nous avons pensé que cette technique ne serait pas d'un intérêt moindre pour l'étude de l'hémolymphe des Crustacés. Celle-ci renferme des protéines de haut poids moléculaire ; il peut donc être très instructif d'observer leur comportement dans un gel d'amidon.

Du point de vue pratique, nous avons adapté la technique originale à notre sujet en utilisant la cuve à usages multiples, ce qui représente une notable simplification.

Décrivons-en les modalités.

B. — Technique.

1. *Hydrolyse de l'amidon.*

Tous les essais ont été faits à partir d'un stock de fécule de pommes de terre « Le Sommet ». Cet amidon commercial très répandu et peu coûteux a toujours donné d'excellents résultats.

Son hydrolyse partielle a été obtenue de la manière suivante :

Dans une étuve réglée avec précision à 38°5 C, on met en équilibre de température pendant deux heures, d'une part un bécher de 2 l avec 300 g d'amidon, d'autre part, dans un flacon bouché, 600 ml d'acétone anhydre additionnés de 6 ml d'HCl concentré pur.

Au bout de ce temps, l'acétone chlorhydrique est versée sur l'amidon et celui-ci mis en suspension avec un agitateur. La durée de l'hydrolyse est comptée à partir de cet instant et le mélange séjourne dans la même étuve pendant 75 minutes exactement. Ce temps a été choisi, après plusieurs essais, comme donnant des gels de consistance convenable. Il n'est valable que pour le stock considéré et demanderait à être réévalué pour des amidons de provenances différentes.

Après ce délai, on décante rapidement la solution acétonique surnageante et, pour bloquer l'hydrolyse, on la remplace par 150 ml d'une solution molaire d'acétate de sodium dans laquelle l'amidon est remis en suspension.

La pâte obtenue est transférée sur un buchner de 15 cm de diamètre, garni de papier filtre et monté sur fiole à vide. Après un premier essorage, elle est lavée avec 6 l d'eau distillée en réglant une aspiration modérée. Cette quantité d'eau s'est avérée suffisante pour une bonne élimination des sels.

A la suite d'un nouvel essorage, l'amidon est séché avec 1 l d'acétone anhydre qui doit passer très lentement dans le buchner. Après un dernier essorage, la poudre obtenue est étalée en couche mince dans une grande cuvette plate et mise à sécher à l'étuve à 45° C pendant deux heures.

Certains auteurs affirment que l'amidon hydrolysé ainsi obtenu ne peut se garder plus d'une semaine. Pour notre part, en conservant le produit dans un flacon hermétiquement bouché, nous n'avons jamais observé d'altération, même après plusieurs mois.

2. Préparation du gel.

Nous avons opéré strictement suivant les indications de O. SMITHIES.

Dans un erlenmeyer de 500 ml, on mélange 15 g d'amidon hydrolysé et 100 ml de tampon. On chauffe à feu nu, avec une flamme moyenne, en agitant le contenu par rotation du récipient. Au bout d'un certain temps, le mélange s'épaissit et se prend en une masse opaque. On continue à chauffer en poursuivant l'agitation avec un agitateur en verre, tout en continuant la rotation de l'erlenmeyer afin d'éviter toute surchauffe locale. L'amidon redevient fluide et transparent. Après quelques secondes d'ébullition, on le soumet à la dépression d'une trompe à eau pour chasser les bulles d'air. Pour rendre ce dégazage efficace, il est recommandé de pousser plusieurs fois de suite la dépression jusqu'à une montée de l'amidon en gros bouillons au sommet de l'erlenmeyer, puis de la supprimer brusquement. Toutes ces opérations doivent être très rapides et, lorsque les dernières bulles ont disparu, on peut couler le gel.

3. Coulée du gel.

Nous avons toujours coulé directement le gel dans la cuve à usages multiples suivant les détails opératoires déjà énoncés. Soulignons à nouveau que ce procédé simplifie beaucoup toute la technique qui a la réputation d'être délicate. Elle devient de la sorte presque plus aisée que celle de l'électrophorèse en gélose.

Le fait de pouvoir régler à volonté le format des plaques la rend d'un emploi plus souple. Il faut cependant remarquer que le choix de grandes dimensions nécessite de plus grandes quantités de gel qui ne peuvent s'obtenir sans certaines précautions. Si 200 ml peuvent encore être obtenus dans un erlenmeyer de 500 ml, bien que le dégazage soit déjà beaucoup plus difficile, il n'en est plus de même pour des volumes plus importants. Ceux-ci exigent l'emploi d'erlenmeyers plus grands (1 l et plus), afin que l'épaisseur du gel au fond du récipient reste relativement faible. L'augmentation de la surface de chauffe qui en résulte accroît la difficulté d'un chauffage uniforme et demande une agitation encore plus intense. Il convient donc d'adapter le récipient et la source de chaleur à chaque cas particulier.

L'épaisseur maxima du gel peut atteindre 8 ou 9 mm. La quantité de gel à préparer se calcule aisément à partir des dimensions choisies, mais il est bon de prévoir un léger excès, car la viscosité du gel ne permet guère une vidange intégrale du récipient.

Après la coulée, il est indiqué de laisser reposer le gel pendant une heure ou deux dans la cuve close pour qu'il acquière une meilleure consistance. On peut alors insérer les échantillons de sérum.

4. *Insertion des échantillons.*

On peut choisir entre les deux procédés préconisés par O. SMITHIES.

a) *Insertion sur papier filtre.*

C'est le mode que nous avons utilisé le plus fréquemment. Pour chaque plaque de 180×40 mm, nous avons découpé un rectangle de papier filtre (Arches 302) de 25×5 mm. Sur ce rectangle maintenu avec des pinces fines, on dépose la quantité de sérum qu'il est susceptible d'absorber sans devenir luisant, c'est-à-dire surchargé. On plante alors dans le gel, à la verticale, un fragment de lame de rasoir de 25 mm de long, puis on l'incline légèrement de façon à séparer les deux lèvres de la fente et à pouvoir introduire le rectangle de papier filtre porteur du sérum. Il faut veiller à une parfaite horizontalité du papier et le placer de sorte que son bord supérieur soit à environ 1 mm de la surface du gel. On retire ensuite lentement la lame du rasoir toujours inclinée, en évitant que la jonction progressive des deux lèvres n'emprisonne de bulles d'air. Une fois la fente bien fermée, la plaque est prête à l'électrophorèse.

b) *Insertion en pâte d'amidon.*

Ce procédé, plus compliqué que le précédent, a l'avantage d'une moindre absorption des protéines sur la ligne de départ. Le papier retient en effet certains composants du sérum, inconvénient qui est beaucoup atténué avec l'amidon en poudre.

On opère en mélangeant dans un verre de montre, une quantité de sérum qui dépend du format de plaque choisi, avec un peu d'amidon en poudre, jusqu'à obtention d'une pâte semi-fluide. Dans une cuvette de 1, 2 ou 3 mm de large, découpée au rasoir dans le gel, on dépose cette pâte à l'aide d'une spatule très fine. Elle durcit rapidement et fait corps avec le gel environnant.

5. Le tampon.

Nos premiers essais ont été réalisés avec la solution tampon au borate préconisée par SMITHIES et dont nous rappelons la composition :

Tampon borate :

Acide borique	1,855 g
NaOH	0,480 g
Eau distillée q. s. p.	1.000 ml

(Force ionique en borate de Na = 0,03 ; pH = 8,9)

L'acidité de l'amidon hydrolysé fait, en général, descendre ce pH à 8,5 ou 8,3 lors de la confection du gel.

Le tampon borate donne une excellente séparation des fractions protéiques du sérum humain et les résultats avec le sérum de *Carcinus maenas* sont aussi satisfaisants.

Cependant dans un but de simplification, nous avons essayé de le remplacer par le tampon véronal/HCl utilisé pour la gélose. Dans ce cas, les bacs à tampon reçoivent la solution-mère, alors que pour la confection du gel, celle-ci est diluée de moitié. Comme on le verra par la suite, cette modification convient parfaitement à l'hémolymph de Crabe.

6. Electrophorèse.

Du fait que les extrémités du gel plongent directement dans le tampon, ce qui réduit au minimum la chute de potentiel intermédiaire, il suffit d'employer un courant de 110 volts aux bornes de la cuve pendant huit heures pour obtenir une excellente séparation.

Dans de telles conditions, il n'est pas nécessaire de travailler en chambre froide.

7. Coloration.

O. SMITHIES a montré que la séparation des fractions n'est satisfaisante que dans la partie interne du gel et qu'il convient donc de dégager celle-ci pour la colorer.

Pour ce faire, on pose la plaque de verre et son gel sur un rectangle de plexiglas de 200×80 mm, à l'une des extrémités duquel est collée, dans le sens de la largeur, une cale de même nature destinée à empêcher un glissement de la lame de verre. De chaque côté du gel, on pose ensuite une règle en plexiglas dont l'épaisseur est choisie en fonction de celle de l'amidon. Le bord supérieur de ces règles doit arriver à mi-hauteur du gel. Il suffit alors de traverser ce dernier avec un fil métallique très fin (fil de magnétophone par exemple), bien tendu sur les deux règles-guides, pour obtenir un clivage régulier. Après avoir posé une seconde lame de verre 180×40 mm sur la face supérieure du gel, on dresse l'ensemble verres - amidon sur un champ longitudinal. Avec précaution, en s'aidant d'un scalpel, on peut, dans ces conditions, séparer les deux moitiés du gel qui seront chacune portées par une lame pour leur transfert dans le bac de coloration.

La coloration se fait en recouvrant la face supérieure de chaque moitié d'une solution d'amidoschwarz 10 B de formule :

Amidoschwarz 10 B	1 g
Méthanol	50 ml
Eau distillée	50 ml
Acide acétique	10 ml

Après une ou deux minutes, ce colorant est remplacé par une solution de lavage de formule :

Méthanol	100 ml
Eau distillée	100 ml
Acide acétique	10 ml

Les lavages sont poursuivis jusqu'à ce que le fond de l'amidon devienne presque blanc et les fractions protéiques bien visibles. On peut faire une économie notable de méthanol en récupérant les solutions de lavage plus ou moins teintées dans une gamme de trois ou quatre récipients et en s'en réservant dans l'ordre de la coloration décroissante, la solution fraîche restant réservée aux seuls lavages terminaux. On peut aussi décolorer les solutions usagées sur noir animal et s'en servir à plusieurs reprises.

Le fait de cliver le gel en son milieu donne naturellement la possibilité d'employer deux colorations différentes pour un même échantillon. Avec un jeu de règles-guides d'épaisseurs appropriées, on peut même découper une bande médiane à l'intérieur du gel et augmenter encore le nombre des possibilités.

Une fois colorées, les plaques se conservent en récipients clos avec fond garni d'un peu de solution de lavage pour éviter la dessiccation de l'amidon.

C. — Résultats.

1. Essais avec différents tampons.

a) Tampon borate.

Avec ce tampon, dont la composition a été donnée plus haut, nos conditions expérimentales ont fourni, pour le sérum humain, des résultats tout à fait semblables à ceux de SMITHIES. De l'anode vers la cathode, on peut dénombrer : 2 préalbumines, 1 post-albumine, 1 fraction α_2 rapide, 1 fraction β , 3 fines bandes α β , 1 α_2 -lente et, en position cathodique par rapport à la fente d'insertion, les γ -globulines.

En 7 h. 30 de migration à la température ambiante, le déplacement moyen de l'albumine est de 5 cm. Les différentes fractions sont nettes et parfaitement rectilignes.

Dans les mêmes conditions, l'électrophorèse d'un sérum de Crabe δ choisi pour ses distale et intermédiaire fortes a révélé l'existence de neuf fractions qui, de l'anode à la cathode, sont :

- une bande large, peu colorée, à 4,8 cm du start ;
- une bande analogue à la précédente, à 3,8 cm du start ;
- une ligne très intense et nette, ayant migré de 2,8 cm et qui est précédée par une bande plus large dont elle semble former la frontière postérieure ;

- une ligne intense et nette, un peu plus large que la précédente, à 2 cm du départ ;
- une bande analogue à la précédente, paraissant dédoublée, à 1,5 cm ;
- une ligne très fine, mais bien visible, à 1,2 cm ;
- une seconde ligne très fine et peu colorée, à 1,1 cm ;
- une bande plus large et floue se situant à 6 mm de l'origine.

La figure 33 a ci-dessous montre côte à côte l'électrophorèse du sérum humain et celle du sérum de Crabe.

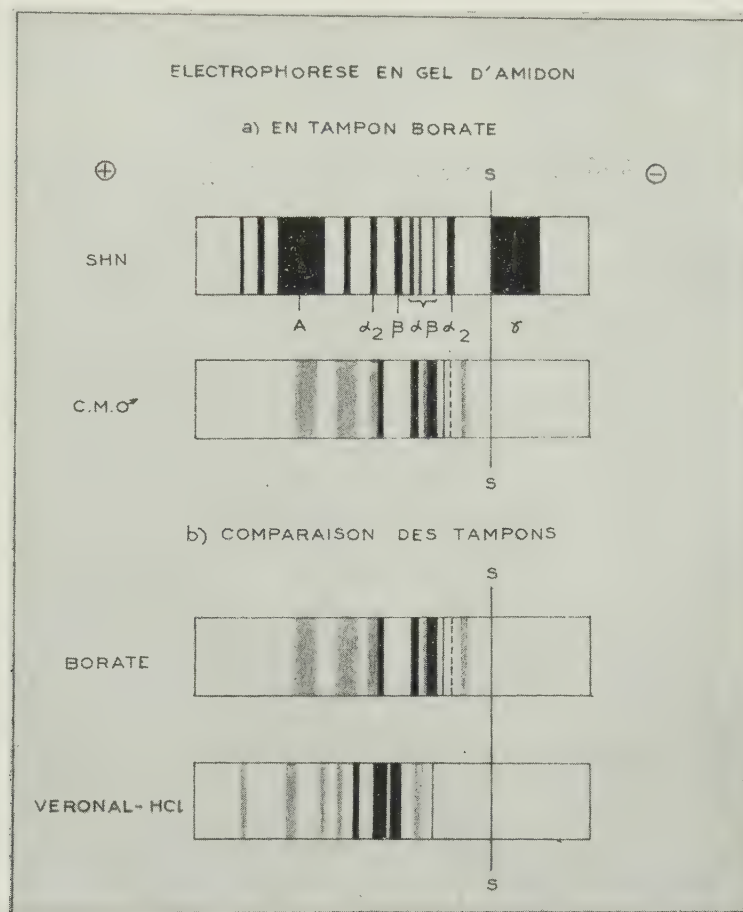


FIG. 33. — Electrophorèse en gel d'amidon avec deux tampons différents.
SHN = sérum humain normal ; C. M. ♂ = sérum de Crabe ♂.

Ce parallèle impose de prime abord une constatation importante. En gel d'amidon, les fractions principales du sérum de Crabe migrent beaucoup plus lentement que l'albumine humaine. Cette lenteur illustre bien le rôle particulier du gel d'amidon dans l'électrophorèse. Alors que sur papier et en gélose, l'hémocyanine distance de beaucoup l'albumine dans son déplacement, que la fraction intermédiaire se tient à la hauteur de cette dernière, il n'en est plus de même dans le nouveau substrat, sans que l'on puisse

incriminer le pH qui reste à peu près le même. La plupart de ces protéines sont fortement retardées, ce qui ne peut s'expliquer que par la taille considérable de leurs molécules qui sont freinées au passage dans les pores très réduits du gel. La migration observée est donc la résultante du déplacement électrophorétique réel et de cet effet freinateur.

On conçoit d'ores et déjà tout l'intérêt que pourra présenter dans des recherches futures l'emploi conjugué et comparatif des méthodes d'électrophorèse sur papier, en gélose et en gel d'amidon, pour l'évaluation de la taille relative de diverses molécules protéiques. Si, par exemple, deux protéines différentes ont, en gélose, des vitesses de migration identiques — ce qui laisse supposer des charges électriques du même ordre — l'observation de leurs vitesses respectives en gel d'amidon pourra donner des renseignements nouveaux quant à l'encombrement de leur molécule.

b) *Tampon véronal/HCl.*

Dans le but de ne pas multiplier les solutions tampon employées au laboratoire, nous avons recherché si celle qui sert couramment pour les électrophorèses en gélose ne pouvait pas également être utilisée en gel d'amidon. Nous l'avons donc expérimentée dans les conditions précisées ci-dessus.

Avec le sérum humain, ce système donne de bonnes séparations, mais il ne met pas en évidence toutes les fractions isolées par le tampon-borate et certaines positions sont nettement modifiées. Sans entrer dans le détail de ces changements, disons que tout se passe comme si on réalisait une meilleure séparation des fractions les plus anodiques en tampon-véronal et des fractions les plus cathodiques en tampon-borate. D'autre part, on constate que les bandes sont plus nettes et plus étroites en tampon-véronal.

Nous avons pensé que, puisque le sérum de Crabe renferme surtout des protéines à migration anodique, le tampon-véronal devait en donner une meilleure séparation. L'expérience a confirmé cette supposition, comme le montre la figure 33 b (page 159), où les deux électrophorèses d'un même sérum de Crabe ♀ se trouvent juxtaposées. On remarque de suite que l'ensemble du déplacement électrophorétique est plus considérable avec le tampon-véronal. De plus, les fractions les plus anodiques sont plus nombreuses et on peut en compter quatre au lieu de deux, en avant de la première bande très colorée. Les trois fractions très colorées qui suivent sont toutefois moins bien séparées, mais cela ne nuit pas à leur identification.

En résumé, ces expériences comparatives montrent que, suivant que l'on voudra étudier en détail telle ou telle fraction protéique, on aura intérêt à employer l'une ou l'autre des deux solutions-tampon. Dans des travaux de première approche, le tampon-véronal HCl donnera des renseignements très suffisants. Il devra de même avoir priorité lorsqu'il s'agira d'approfondir l'étude des protéines les plus anodiques. Par contre, le tampon-borate sera plus recommandé chaque fois qu'une meilleure définition des fractions les plus cathodiques sera recherchée.

2. *Nature des fractions mises en évidence.*

Après avoir étudié les conditions techniques et dénombré les fractions apparues, il restait à en identifier le plus grand nombre et à rechercher leur correspondance avec les fractions isolées par les autres méthodes.

Ce travail est loin d'être achevé et nous n'en donnerons ici que les premiers résultats.

Le procédé le plus simple consiste à étudier des sérums dont la composition est déjà connue par électrophorèse sur papier ou en gélose et à considérer le retentissement des variations de ces compositions sur les figures électrophorétiques obtenues en gel d'amidon.

La figure 34 ci-dessous concrétise un tel essai qui a été fait en tampon-borate dans les conditions ordinaires. On y trouve de haut en bas :

- un sérum humain ;
- un sérum de Crabe ♀ indemne, très orange, à distale et proximale fortes sur papier ;
- un sérum de Crabe ♂ sacculiné, à distale forte et intermédiaire douteuse ;
- un sérum de Crabe ♂ indemne, à distale et intermédiaire fortes.

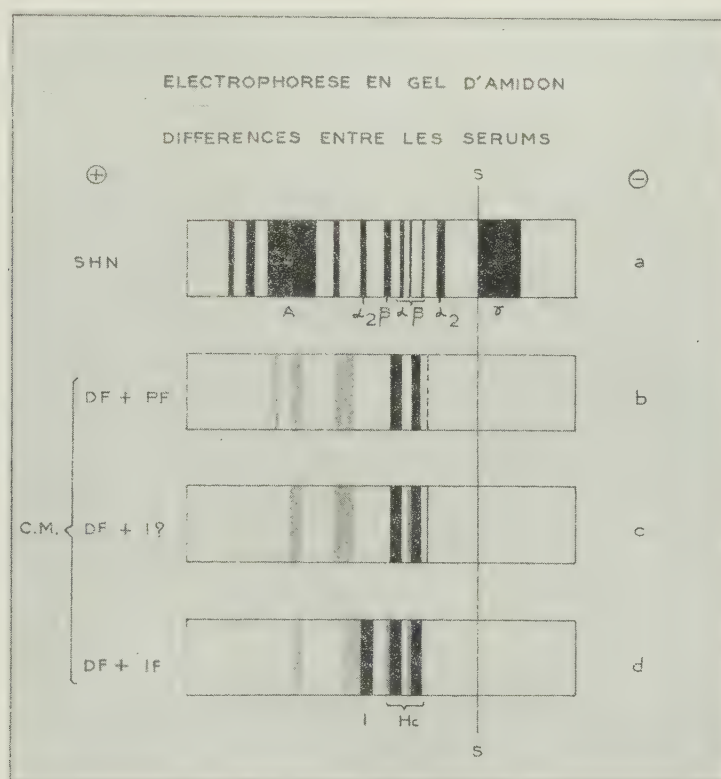


FIG. 34. — Variations des différentes fractions électrophorétiques en gel d'amidon suivant les sérums. a) Sérum humain normal ; b) Sérum de Crabe ♀ en vitellogénèse ; c) Sérum de Crabe ♂ sacculiné ; d) Sérum de Crabe ♂ indemne.

On constate que, parmi les cinq fractions bien visibles par leur coloration, trois sont plus colorées que les autres. Dans tous les cas, c'est la plus lente d'entre elles, celle qui se trouve à peu près au niveau des $\alpha\beta$ - humaines, qui fixe l'amidoschwarz avec le plus d'intensité. Comme les trois sérums n'ont en commun qu'une distale forte, il est probable qu'en gel d'amidon la fraction précitée comporte l'hémocyanine. La seconde bande,

qui a approximativement la vitesse de migration des β -globulines humaines, est également bien colorée et présente dans les trois hémolymphes. Ceci laisse supposer qu'elle fait aussi partie du groupe distal (papier) et représente peut-être une forme différente de l'hémocyanine. La troisième fraction, qui se situe à hauteur des α_2 -rapides du sérum humain, n'est visible que dans le sérum de Crabe détenteur d'une intermédiaire prononcée. Elle fait défaut dans les deux autres sérums, à moins que la bande visible dans ceux-ci, entre la post-albumine et les α_2 -rapides, n'en représente une fraction ayant migré plus vite du fait d'une moindre concentration. On peut donc admettre que cette protéine particulière au sérum n° 4 correspond à la fraction intermédiaire ou en fait partie.

Ouvrons ici une parenthèse pour signaler que, dans un travail récent, K. R. WOODS, E. C. PAULSEN, R. L. ENGLE et J. H. PERT (1958) ont comparé par électrophorèse en gel d'amidon le milieu intérieur d'un certain nombre d'Arthropodes et de Mollusques et supposent que toutes les fractions importantes qu'ils séparent par ce moyen correspondent à l'hémocyanine. Nous venons de constater qu'au moins chez *Carcinus maenas* cela n'est pas le cas et, une fois encore, il nous paraît nécessaire d'attirer l'attention sur cette erreur, très répandue et depuis trop longtemps accréditée, qui veut que l'hémocyanine soit la seule protéine importante des Crustacés.

On notera encore que la fraction proximale (papier) du sérum n° 2 n'apparaît pas en gel d'amidon. Il est probable qu'avec le tampon employé, elle n'a subi aucun déplacement et est restée dans la fente d'insertion.

Pour nous en assurer, nous avons fait une électrophorèse du même sérum en tampon-véronal/HCl et dans un gel d'amidon à 10 % seulement, donc avec des pores plus lâches que ceux d'un gel à 15 %. Dans ces conditions, on note une migration plus rapide des principales fractions, un pouvoir séparateur moindre, mais on voit apparaître très nettement, à environ 1 cm du côté anodique de la fente d'insertion, une bande colorée, plus largement étalée que toutes les autres et qui ne peut être que la fraction proximale (fig. 34, page 163).

Il a été admis plus haut que deux des fractions principales mises en évidence par le gel d'amidon pouvaient correspondre à des molécules d'hémocyanine de taille et de poids moléculaire différents. Pour le contrôler, nous avons essayé d'utiliser la propriété que possède l'urée de cliver la grosse molécule hémocyanique en fractions plus petites. Dix minutes après l'addition d'urée à un sérum de Crabe, il a été procédé à son électrophorèse en gel d'amidon, parallèlement à un échantillon non traité. Après coloration, aucune différence ne peut être notée entre les deux protéinogrammes. Un essai analogue fait après six jours d'action de l'urée donne les mêmes résultats. Pour l'instant, et jusqu'à plus ample informé, il faut donc conclure, soit que les fractions envisagées ne correspondent pas à des hémocyanines différentes, soit que l'action de l'urée n'est que temporaire et que, cette substance étant peut-être séparée de l'hémocyanine par la migration électrophorétique, les molécules protéiques, passagèrement scindées, se ressoudent pour rétablir l'état antérieur.

3. Mise au point d'une microméthode.

Si, en vue de l'étude détaillée d'un sérum, il est toujours plus instructif et préférable d'employer la macrométhode qui a été décrite, dans des travaux préliminaires ou des sélections de sérums, on pourra gagner un temps précieux en utilisant la microméthode que nous avons élaborée.

Pour sa réalisation, la cuve à usages multiples doit être équipée de ses accessoires pour microélectrophorèse. Comme dans la technique homologe en gélose, on dispose sur la plaque de surélévation neuf lames histologiques standard. Les règles d'arrêt étant calées par des charges quelconques pour éviter tout déplacement pendant la coulée, les lames sont recouvertes de 200 ml d'un gel d'amidon à 15 % préparé suivant le procédé classique. Après une ou deux heures de refroidissement sous courant d'eau, d'éventuelles irrégularités du ménisque de la face supérieure du gel peuvent être éliminées aisément à l'aide d'un fil de magnétophone glissant, tendu, sur les deux règles latérales qui servent de cales.

Le dépôt du sérum se fait par la méthode au papier filtre, en se servant d'un fragment de la lame de rasoir de 10 mm avec lequel, à 10 mm du bord cathodique, on réalise une fente pour chaque lame-support. Dans cette fente, on introduit un rectangle de papier filtre de 3×10 mm imbibé de sérum. Une telle surface peut au maximum absorber 10 mm^3 de liquide. Dans les cas où l'on dispose de très peu de substance à analyser, on peut encore réduire la longueur du papier de moitié et faire deux insertions par lame, de 5 mm chacune. Il devient alors possible de faire 9 ou 18 analyses simultanées (fig. 35, ci-dessous).

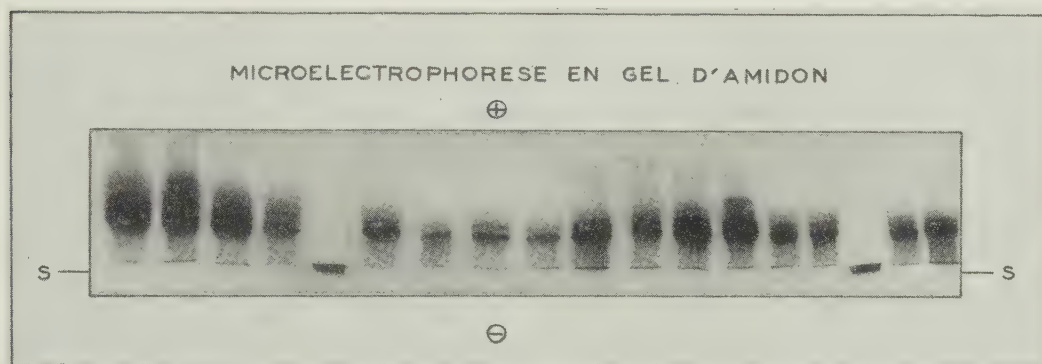


FIG. 15. — Microélectrophorèse simultanée en gel d'amidon, de 18 sérums de Crabes.

Une fois les insertions terminées, on enlève les règles d'arrêt avec les précautions d'usage pour faire monter le tampon sur le plateau central jusqu'à contact avec le gel. Une tension de 110 volts appliquée aux bornes de la cuve fournit une intensité totale de 800 milliampères dans ces conditions d'expérience. De la sorte, une séparation suffisante des principales fractions peut déjà être obtenue en deux heures. Dans le cas du sérum de Crabe, ces fractions se sont déplacées de 15 mm environ. La sérumalbumine humaine subit, elle, une migration de 30 mm. Découpées et clivées, les différentes lames sont ensuite colorées par le procédé ordinaire. On peut ainsi obtenir très rapidement de précieuses indications sur la composition protéique de nombreux sérums.

Cette microméthode nous a servi à analyser dans les plus brefs délais de nombreux sérums de Crabes et à récolter des renseignements préliminaires sur les variations de leurs diverses fractions suivant les individus. Ces essais ont confirmé la constatation antérieure d'une correspondance entre la bande 4 et la fraction I sur papier. Ils ont

également montré que les deux bandes que nous supposons dues à l'hémocyanine varient beaucoup dans l'intensité relative de leur coloration. Dans tous les cas, c'est la fraction la plus lente qui est la plus importante. Il arrive cependant que la seconde de ces bandes soit presque aussi intense que sa voisine. A l'heure présente, nous n'avons pas encore reconnu le déterminisme de ces variations et l'on ne pourra y parvenir qu'en répétant plus encore de telles électrophorèses sur des sérums d'animaux à des stades physiologiques parfaitement connus.

4. Conclusions.

Ces travaux d'électrophorèse du sérum de *Carcinus maenas* en gel d'amidon ne doivent être considérés que comme préliminaires. Ils ont ouvert une voie dont, sans crainte d'erreur, on peut dire qu'elle sera extrêmement fructueuse pour notre connaissance des protéines des Crustacés.

Notre objectif immédiat a été d'adapter cette technique récente à ce nouveau sujet. Des essais comparatifs ont montré que le tampon-véronal/HCl donne d'excellents résultats dans ce cas particulier et peut être substitué au tampon-borate de la méthode originale. L'existence d'au moins dix fractions protéiques différentes a été révélée. La correspondance de certaines avec des fractions connues sur papier ou en gélose a été établie. Dans l'ensemble, le déplacement de ces molécules volumineuses est beaucoup plus lent dans le gel d'amidon que dans les autres supports, ce qui démontre à nouveau, de façon indubitable, le rôle freinant de ce gel. Cette observation est particulièrement nette pour l'hémocyanine, laquelle, par ailleurs, se subdivise en deux sous-fractions d'importance variable. La tentative de modifier les proportions de ces sous-fractions par action prolongée de l'urée n'a pas donné de résultat.

Enfin, de nouvelles recherches dans ce domaine seront grandement facilitées par la mise au point qui a été faite d'une microméthode rapide et de grande série.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Chapitre I.

La biochimie de *Carcinus maenas* Linné n'est encore que peu connue. Le travail qui vient d'être exposé apporte des informations nouvelles sur ce sujet.

Les recherches qu'il décrit ont été faites sur de nombreux échantillons de population de ces animaux, originaires de la Manche (Roscoff) ou du littoral méditerranéen (Etang de Thau). Le choix de l'une ou l'autre de ces provenances a été guidé par les avantages respectifs de ces deux espèces de Crabes par rapport au but poursuivi.

Les animaux ont été soumis à l'expérimentation, soit directement après la pêche, soit après conservation en milieu fixateur, soit encore au cours d'élevages réalisés dans diverses Stations biologiques ou dans l'installation à eau de mer de l'Institut de Biologie de Nancy. Celle-ci a été pourvue d'un dispositif semi-automatique de nettoyage qui permet des gains de temps considérables lors de l'entretien des Crabes en captivité.

Un bref rappel de la biologie de *Carcinus maenas* informe le lecteur non naturaliste de quelques problèmes posés par cet animal, notamment celui de sa « castration parasitaire » par le Rhizocéphale *Sacculina carcini* Thompson. Il apprend de la sorte que le déterminisme des modifications que ce parasite fait subir aux caractères sexuels secondaires de son hôte n'a jamais pu être précisé, pas plus que n'ont pu être démontés les rouages intimes du mécanisme de la détermination du sexe chez les Crustacés en général.

Les diverses hypothèses émises à propos de ces problèmes sont évoquées, avant que ne soit brossé le tableau des connaissances biochimiques antérieurement acquises dans la recherche de leur solution.

Chapitre II.

Le second chapitre s'attache à réfuter l'hypothèse de G. SMITH concernant le rôle des lipides dans la féminisation des caractères sexuels des Crabes sacculinés.

Une étude détaillée est d'abord faite de la genèse de cette hypothèse, qu'elle replace dans son contexte de l'histoire scientifique pour montrer comment elle s'intègre dans le cadre des théories qui, au début du siècle, ont cherché une solution au problème de la détermination du sexe.

Elle est suivie de l'énumération des observations faites sur *Carcinus* et *Inachus*, observations qui ont amené G. SMITH à supposer que Sacculine et ovaires ont un même retentissement sur le métabolisme lipidique des Crabes, commandant par cet intermédiaire la différenciation des caractères sexuels secondaires. L'élégante simplicité d'une telle explication se heurte malheureusement à de nombreuses objections dont certaines ont été formulées par SMITH lui-même, alors que d'autres ont conduit à des recherches nouvelles qui sont passées en revue.

Parmi les divers arguments alimentant cette critique, il en est un qui, bien qu'essentiel, n'a jamais reçu de contrôle expérimental. C'est celui qui constate que la Sacculine agit déjà sur les caractères sexuels de son hôte à une époque où, encore interne et peu conséquente, elle ne peut peser d'un grand poids sur le métabolisme lipidique de son hôte.

Le bien-fondé de cette objection est alors démontré par une longue série de dosages d'acides-gras chez les animaux entiers de divers échantillons de population dont le plus important a été récolté au mois d'août dans l'Etang de Thau. La majeure partie de ce matériel est en effet sacculiné.

176 analyses concernent ainsi 1.918 Crabes dont on mesure avec précision la longueur et le degré de féminisation. Les résultats obtenus, contrôlés par les tests statistiques habituels, montrent d'abord que, entre certaines limites de taille, il n'y a pas de corrélation entre celle-ci et la teneur en acides-gras des animaux. Par contre, chez les mâles, ce taux lipidique est inférieur à celui trouvé chez les femelles, même lorsque celles-ci n'ont pas encore commencé leur vitellogenèse. Cet écart devient considérable au moment de l'édification des ovules. Une fois ceux-ci expulsés, les femelles sont très pauvres en matières grasses.

En ce qui concerne les animaux sacculinés, il est établi que le parasite ne modifie pas significativement le taux des acides-gras de son hôte, sauf peut-être au moment de la sortie du sac viscéral et de la première croissance de celui-ci. En tous cas, constatation essentielle, une telle action n'existe pas tant que le parasite est interne. Il n'y a en effet aucune corrélation entre le taux des matières grasses et le degré de féminisation des mâles. Ce résultat est d'autant plus certain qu'il est obtenu par des voies différentes dont les conclusions concordent toutes.

On peut donc affirmer que les lipides ne sont pas, par leurs variations quantitatives, la cause directe ou indirecte de la féminisation des caractères sexuels mâles des Crabes sacculinés.

Il est ainsi démontré que l'hypothèse de G. SMITH ne correspond pas à la réalité des faits.

Chapitre III.

La découverte récente d'une glande androgène chez les Crustacés ne laisse plus aucun doute quant à la nature hormonale du déterminisme sexuel des Crustacés. Mais on ignore tout, pour l'instant, de la nature chimique des substances qui sont en jeu. La question se pose notamment de savoir si ces hormones ont une composition analogue à celle des corps qui régissent la différenciation sexuelle des Vertébrés.

Une réponse est cherchée par deux voies différentes.

La première consiste à rechercher dans les testicules, l'hémolymph et l'hépatopan-crées des Crabes ♂, des 17-cétostéroïdes, métabolites ordinaires des hormones sexuelles de Vertébrés. L'adaptation de la technique classique de détection de ces corps dans l'urine humaine à ces substrats reste infructueuse. Seuls les extraits de testicules donnent une coloration rouge marquée avec le métadinitrobenzène, mais celle-ci ne présente pas la nuance caractéristique des stéroïdes oxygénés en C 17. Un fractionnement chromatographique des extraits sur alumine reste également sans résultat. Il permet cependant la mise au point de perfectionnements techniques susceptibles d'intéresser les méthodes chromatographiques en général.

La seconde voie comporte des injections d'hormones pures de Vertébrés à des lots de Crabes qui reçoivent ainsi diverses doses d'hormones gonadotropes, somatotrope, adrénocorticotrope, androgène et oestrogène. Aucune modification macroscopiquement observable n'est constatée après ces traitements que les sujets subissent en général sans dommage et qui seraient donc susceptibles d'être prolongés et contrôlés histologiquement.

Ces deux séries d'essais montrent ainsi qu'il n'y a probablement aucune parenté chimique entre les hormones sexuelles des Vertébrés et celles des Crustacés.

Dans un ordre d'idées voisin, des injections d'extraits lipidiques et déprotéinés de sac viscéral de Sacculine sont faites à des Crabes indemnes. Elles montrent que la toxicité trouvée par d'autres auteurs dans de tels extraits non déprotéinés est entièrement conservée, donc qu'elle n'est pas due à des chocs de nature immunologique.

Par contre, des injections de sérum de Crabes parasités à des individus sains sont relativement bien supportées. Ceux-ci sont aussi très friands de la substance même des sacs viscéraux et s'en nourrissent volontiers.

A aucun moment, une modification des caractères sexuels ne peut être constatée après ces expériences. La Sacculine ne semble donc pas renfermer, ou déverser dans le sang de son hôte, de principes féminisants.

Chapitre IV.

L'analyse chromatographique sur papier, uni- et bidimensionnelle, met en évidence dans l'hémolymph de *Carcinus maenas* les acides-aminés libres suivants : acide aspartique, acide glutamique, glycolle, tyrosine, valine, proline, arginine.

Une hydrolyse chlorhydrique du sérum et une chromatographie consécutive permettent de dénombrer : acide aspartique, acide glutamique, sérine, glycolle, thréonine, alanine, tyrosine, histidine, lysine, arginine, proline, valine, leucine et isoleucine. Deux taches supplémentaires n'ont pas été identifiées.

Des essais comparatifs ne révèlent aucune différence qualitative entre les sexes, ni entre les animaux indemnes et parasités. Sous réserve d'études quantitatives encore à faire, l'action de la Sacculine ne paraît donc pas s'exercer par l'intermédiaire de ces substances.

Chapitre V.

Après un rappel sommaire du principe général de l'électrophorèse et des travaux antérieurs réalisés par cette méthode chez les Crustacés, la technique d'électrophorèse sur papier est adaptée à l'étude de la composition protéique de l'hémolymph du Crabe.

Un effort analytique considérable portant sur des milliers d'animaux est entrepris pour éclairer la causalité des variations physiologiques ou pathologiques de cette composition.

Il est d'abord montré que, contrairement à une opinion trop répandue, l'hémocyanine n'est pas la seule protéine du milieu intérieur des Crustacés. L'électrophorèse sur papier met en effet en évidence trois groupes protéiques distincts qui sont provisoirement désignés par leur position par rapport à la ligne de départ. Le premier, qui est le plus rapide, est appelé « distal » et renferme l'hémocyanine. Le second, dit « intermédiaire », se situe un peu en retrait du premier et comporte des glycoprotéides. Le troisième, fort proche de la ligne de dépôt et pour cela dénommé « proximal », est constitué par des lipoprotéines et sans doute aussi par des glycoprotéides.

Ces trois fractions peuvent exister simultanément dans un même sérum et être également abondantes. Mais, très souvent, l'une ou l'autre des deux dernières fractions est absente et les quantités respectives varient. Ces variations sont loin d'être simples et échappent, par leurs frontières imprécises, à toute schématisation facile. De multiples essais, faits sur des échantillons d'origines diverses et récoltés en des saisons différentes, permettent de dégager quelques règles générales qui souffrent cependant de nombreuses exceptions.

Tout d'abord, la composition protéique de l'hémolymph change, comme on pouvait s'y attendre, au cours des étapes du cycle d'intermue. Dans les étapes immédiatement post-ecdysiales, les protéines sont très diluées et n'apparaissent la plupart du temps que sous forme d'une distale très affaiblie. Celle-ci se renforce en C₁, C₂, C₃ pour devenir à peu près constante en C₄. La fraction intermédiaire apparaît à des moments variables, quelquefois à l'une ou l'autre des étapes de la période C, mais plus généralement en D₁, D₂ et D₃ où elle devient très importante et peut dépasser l'hémocyanine en quantité. Tout se passe, en somme, comme si une préparation métabolique à la mue se déclenchait avant l'apparition des critères morphologiques servant à la discrimination des étapes du cycle, sans lien rigoureux entre les deux ordres de phénomènes.

Un facteur saisonnier semble également jouer un rôle. Une étude détaillée concernant 711 Crabes et s'étendant sur onze mois de l'année, montre que la fraction intermédiaire est très fréquente dans les premiers mois de l'année, époque de mues nombreuses, alors qu'elle devient exceptionnelle vers la fin de l'été et durant l'automne.

Du point de vue théorique, les attaches qui semblent lier cette fraction au processus de la mue s'harmonisent bien avec sa nature glycoprotéique et il est probable que son étude analytique plus poussée apportera des éléments nouveaux pour l'explication de ce phénomène.

La fraction proximale, exceptionnelle et sans doute pathologique chez les mâles semble, au contraire, caractériser les femelles, surtout au moment de la vitellogenèse. Elle comporte les lipoprotéines — et sans doute des glycoprotéides — qui transitent de l'hépat-

pancréas vers l'ovaire, par l'intermédiaire du vecteur hémolymphé, pour participer à l'édification des ovules. Elle devient considérable dans certains cas anormaux où la ponte paraît ne pas pouvoir se déclencher.

L'ablation des pédoncules oculaires provoque, à brève échéance, chez les mâles, l'apparition de la fraction intermédiaire lorsque celle-ci fait défaut, son renforcement lorsqu'elle existe déjà. Chez les femelles, la même opération a des conséquences analogues, mais elles concernent aussi la fraction proximale qui apparaît ou s'intensifie. Ces modifications sont le reflet métabolique du déclenchement bien connu de la mue et de la ponte par la suppression du complexe glandulaire du pédoncule oculaire.

L'action de la Sacculine sur les fractions protéiques de l'hémolymphé de son hôte paraît très complexe. Tant que le parasite est interne, il agit de façon sensible sur les Crabes jeunes en diminuant l'importance de la distale et en raréfiant la fraction intermédiaire. Une telle action est beaucoup moins prononcée chez les animaux plus gros et, par conséquent, plus résistants. Elle est retrouvée, sans accentuation brutale, chez les Crabes à Sacculine externe. A aucun moment n'a été retrouvée l'augmentation de la teneur en protéines signalée par certains auteurs. De l'ensemble des cas examinés se dégage au contraire l'impression d'une diminution du taux de ces substances.

La comparaison des échantillons de la Manche et de la Méditerranée ne révèle aucune différence qualitative entre les protéines de ces deux espèces de *Carcinus*. Une étude quantitative n'est pas entreprise, la technique ne paraissant pas assez précise pour de telles recherches.

Enfin, l'observation attentive des différents lots de Crabes donne lieu à de nombreuses remarques biologiques dont la plus importante constate que, dans la Manche comme en Méditerranée, la ponte de ces Décapodes se situe durant les mois d'hiver et ne s'étale pas sur toute l'année pour la majorité des individus.

A l'électrophorèse sur papier succèdent des électrophorèses en gélose dont les nombreux avantages sont soulignés.

L'emploi de cette technique est rendu plus facile par la mise au point d'une cuve à électrophorèse à usages multiples qui permet de réaliser, à qualité égale ou améliorée, six techniques différentes :

- l'électrophorèse sur papier ;
- l'électrophorèse en gélose ;
- l'immuno-électrophorèse ;
- la micro-immuno-électrophorèse ;
- l'électrophorèse en bloc d'amidon ;
- l'électrophorèse en gel d'amidon.

L'utilisation de l'appareil pour chacune de ces méthodes est exposée avec précision.

La migration électrophorétique en gélose des protéines du sérum de Crabe confirme les renseignements fournis par le papier, en améliore la qualité et rend possible la distinction de deux ou trois subdivisions de la fraction distale. Un rappel des principales propriétés de l'hémocyanine attire l'attention sur l'importance de cette observation qui confirme, sous certaines réserves, la coexistence chez un même animal de plusieurs hémocyanines à poids moléculaires différents. De nouvelles possibilités sont ainsi offertes à l'étude physicochimique de ce chromoprotéide.

L'immuno-électrophorèse de P. GRABAR et C. A. WILLIAMS, dont l'élégance, la puissance et la finesse d'analyse méritent un exposé circonstancié destiné à vulgariser cette technique parmi les naturalistes, fait ensuite une première incursion dans la classe des Crustacés.

Description est d'abord donnée du mode de préparation d'immun-sérums de Lapin anticrabe à partir de sérums d'individus ♂, ♀, indemnes et sacculinés. Puis, après une étude préliminaire de la richesse de ces liquides en anticorps et de la concentration optima de leur emploi, diverses immuno-électrophorèses apportent les informations suivantes :

- la fraction distale est immunologiquement hétérogène. Dans certains cas, elle révèle trois protéines distinctes qui peuvent correspondre à celles rencontrées dans l'électrophorèse simple en gélose :

- la fraction intermédiaire fournit un arc de précipitation très net à l'approche de la mue, plus flou ou absent aux étapes qui en sont éloignées. La sensibilité de la méthode permet la détection de quantités infimes de ces protéines, même lorsqu'elles sont inapparentes sur papier :

- entre D et I, mais souvent aussi sous I, se placent deux autres protéines, quantitativement plus faibles, dont la nature et le rôle restent ignorés :

- la fraction proximale donne également lieu à un arc de précipitation.

De la sorte, l'immuno-électrophorèse élève à sept le nombre des fractions protéiques décelables dans l'hémolymphe de *Carcinus maenas*.

La plus récente des techniques électrophorétique sur support, l'électrophorèse en gel d'amidon, apporte de nouveaux moyens d'investigation du sujet. Aux critères connus de la migration électrophorétique simple, elle ajoute ceux d'une filtration sélective imposée aux molécules protéiques par la finesse des pores du substrat.

Son utilisation dans la cuve à usages multiples en simplifie le mode opératoire. Son application au sérum de Crabe montre comment le choix du tampon peut favoriser l'étude de telle ou telle fraction. Elle permet de séparer dix fractions différentes. Deux des plus importantes représentent l'hémocyanine qui, ici encore, se trouve donc divisée en deux sous-fractions dont les importances relatives varient avec les individus. Ces proportions ne sont pas modifiées par l'action de l'urée.

La migration des molécules d'hémocyanine est naturellement très ralentie par le gel d'amidon, démontrant de façon indubitable les propriétés particulières de celui-ci. Une fraction un peu plus rapide a été identifiée comme correspondant au groupe intermédiaire du papier. La fraction proximale, également retrouvée, ne migre que dans des conditions expérimentales précises.

Ainsi, le travail qui vient d'être exposé apporte des connaissances nouvelles relatives à la composition du milieu intérieur d'un Crustacé fort commun. Sa partie expérimentale, très développée, met à la disposition de recherches futures un certain nombre de techniques efficaces et éprouvées, qui sont susceptibles d'applications nombreuses dans une partie du Règne animal où elles ne se sont encore que peu exercées. Chacun des résultats qu'elles ont permis d'acquérir chez *Carcinus maenas* s'ouvre sur de nouvelles recherches. Il est hors de doute que leur emploi sera tout aussi fructueux dans d'autres groupes d'Invertébrés. Si le présent travail a démontré l'intérêt de leur utilisation et contribué à leur vulgarisation parmi les Naturalistes, il aura atteint l'un de ses principaux objectifs.

BIBLIOGRAPHIE

- ARVY L., ECHALIER G., GABE M. (1954). — Modifications de la gonade de *Carcinides* (*Carcinus*) *maenas* L., Crustacé Décapode, après ablation bilatérale l'organe Y. *C.R. Ac. Sc.*, **239**, pp. 1853-1855.
- BAUER J. (1952). — Die praktische Bedeutung der C-17-Ketosteroide, ihre chromatographische Trennung und ihre Reindarstellung. *Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med.*, 58. Kongress, pp. 412-416. Verl. J. F. Bergmann, München.
- BIEDL A. (1913). — Innere Sekretion. *Urban u. Schwarzenberg*, Berlin u. Wien, 2. Aufl., 692 p.
- BOULANGER P., BISERTE G. (1949). — Chromatographie des amino-acides libres du plasma sanguin. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **31**, pp. 696-700.
- BRINKMANN A. (1936). — Die nordischen Munidaarten und ihre Rhizocephalen. *Bergens Mus. Skr.*, **18**, pp. 1-111.
- BROEKHUYSEN G. J. Jr (1936). — On development, growth and distribution of *Carcinides maenas* (L.). *Arch. Neerl. Zool.*, **2**, pp. 257-399.
- BRUNTZ L., GAUTRELET J. (1902). — Etude comparée des liquides organiques de la Sacculine et du Crabe. *C.R. Ac. Sc.*, **134**, pp. 349-350.
- BUTENANDT A., KARLSON P. (1954). — Über die Isolierung eines Metamorphose-Hormons der Insekten, in kristallisierter Form. *Z. Naturf.*, **9**, pp. 389-391.
- CALLAN H. G. (1940). — The effects of castration by parasites and X-rays on the secondary sex characters of prawns (*Leander spp.*). *J. exp. Biol.*, **17**, pp. 168-179.
- CAMIEN M. N., SARLET H., DUCHATEAU G., FLORKIN M. (1951). — Non-protein aminoacids in muscle and blood of marine and fresh-water Crustacea. *J. Biol. Chem.*, **193**, pp. 881-885.
- CANTACUZENE J. (1912). — Observations relatives à certaines propriétés du sang de *Carcinus maenas* parasité par la Sacculine. *C.R. Soc. Biol.*, **74**, pp. 109-111.
- CARLISLE D. B., BUTLER C. G. (1956). — The « queen-substance » of Honeybees and the ovary-inhibiting hormone of Crustaceans. *Nature*, **177**, pp. 276-277.
- CASTLE W. (1903). — The heredity of sex. *Bull. Mus. Comp. Zool. Harvard*, **11**, cité par G. SMITH, 1910.
- CHARNIAUX-COTTON H. (1954). — Découverte chez un Crustacé Amphipode (*Orchestia gammarella*) d'une glande endocrine responsable de la différenciation des caractères primaires et secondaires mâles. *C.R. Ac. Sc.*, **239**, pp. 780-782.
- COURCON J., URIEL J. (1958). — Electrophorèse et analyse immuno-électrophorétique en milieu gélosé. *Ann. Biol. Clin.*, **16**, pp. 181-189.
- COURRIER R. (1921). — Sur le déterminisme des caractères sexuels secondaires chez les Arthropodes. *C.R. Ac. Sc.*, **173**, pp. 668-671.
- CREMER H. D., TISELIUS A. (1950). — Elektrophorese von Eiweiss auf Filtrier papier. *Biochem. Z.*, **320**, pp. 273-283.
- DAMBOVICEANU A. (1929). — Recherches sur les constantes physico-chimiques du plasma des Invertébrés à l'état normal et en cours d'immunisation. I. Constantes du plasma de quelques Crustacés Décapodes à l'état normal. *Arch. Roum. Pathol. Exp. Microbiol.*, **2**, pp. 5-38.

- DAMBOVICEANU A. (1932). — Composition chimique et physico-chimique du liquide cavitare chez les Crustacés Décapodes (Physiologie de la calcification). *Arch. Roum. Pathol. Exper. Microbiol.*, 3, pp. 239-309.
- DELAUNAY H. (1934). — Métabolisme de l'ammoniaque d'après les recherches relatives aux Invertébrés. *Ann. Physiol. Physico-chim. Biol.*, 10, pp. 695-724.
- DEMEUSY N. (1958 a). — Recherches sur la mue de puberté du Décapode *Carcinus maenas* L. *Arch. Zool. Exp. Gén.*, 93, pp. 253-491.
- DEMEUSY N. (1958 b). — Influence de l'ablation des pédoncules oculaires sur la glande androgène de *Carcinus maenas* L. *C.R. Ac. Sc.*, 246, pp. 1104-1107.
- DEMEUSY N. (1959). — Pédoncules oculaires, glande de mue et appareil génital chez *Carcinus maenas* L. *C.R. Ac. Sc.*, 248, pp. 2652-2654.
- DEMEUSY N., LENEL R. (1954). — Effet de l'ablation des pédoncules oculaires sur la fréquence de la ponte chez *Carcinus maenas* Pennant. *C.R. Soc. Biol.*, 148, pp. 156-158.
- DONAHUE J. K. (1948). — Fluorimetric and biological determination of estrogens in the eggs of the American Lobster (H. a.). *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 69, pp. 179-181.
- DONAHUE J. K. (1949). — Determination of natural estrogens in marine eggs by biological and fluorimetric procedures. *Americ. J. Physiol.*, 159, pp. 567-568.
- DRACH P. (1939). — Mue et cycle d'intermue chez les Crustacés Décapodes. *Ann. Inst. Océan. Monaco*, 19, pp. 103-391.
- DRACH P., LAFON M. (1942). — Etudes biochimiques sur le squelette tégumentaire des Décapodes Brachyours. *Arch. Zool. Exp. Gén.*, 11, pp. 301-326.
- DRACH P., TEISSIER G. (1939). — Mue et protidémie chez les Crabes. *C.R. Soc. Biol.*, 131, pp. 1199-1201.
- DRILHON A. (1935). — Etude biochimique de la mue chez les Crustacés Brachyours. *Ann. Physiol. Physico-chim. Biol.*, 11, pp. 301-326.
- DRILHON A. (1936). — Quelques constantes chimiques et physico-chimiques du milieu intérieur du Crabe sacculiné (*Carcinus maenas*). *C.R. Ac. Sc.*, 202, pp. 981-992.
- DRILHON A. (1937). — Influence du parasitisme sur l'équilibre minéral des tissus (La Sacculine chez le Crabe). *C.R. Ac. Sc.*, 204, pp. 913-915.
- DRILHON A., BUSNEL R. G. (1950). — Sur la présence et la nature des acides-aminés libres dans l'hypoderme de Crustacés de types pigmentaires variés. *C.R. Ac. Sc.*, 230, pp. 682-683.
- DRILHON A., PORA E. A. (1936). — Sacculine et Crabe : étude chimique et physico-chimique. *Trav. Stat. biol. Roscoff*, 14, pp. 111-120.
- DUCHATEAU G., FLORKIN M. (1954). — Types de composition du pool des acides-aminés non protéiques des muscles. *Arch. intern. Physiol.*, 62, pp. 487-504.
- DUCHATEAU G., SARLET H., CAMIEN M. N., FLORKIN M. (1952). — Acides-aminés non protéiques des tissus chez les Mollusques Lamellibranches et chez les Vers. Comparaison des formes marines et des formes dulcicoles. *Arch. intern. Physiol.*, 60, pp. 124-125.
- DURRUM E. L. (1950). — A microelectrophoretic and microionophoretic technique. *J. Amer. Chem. Soc.*, 72, pp. 2943-2948.
- ECHALIER G. (1954). — Recherches expérimentales sur le rôle de l'organe Y dans la mue de *Carcinus maenas* L., Crustacé Décapode. *C.R. Ac. Sc.*, 238, pp. 523-525.
- ECHALIER G. (1955 a). — Rôle de l'organe Y dans le déterminisme de la mue de *Carcinides* (*Carcinus*) *maenas* L., Crustacé Décapode : expériences d'implantation. *C.R. Ac. Sc.*, 240, pp. 1581-1583.
- ECHALIER G. (1955 b). — Influence de l'organe Y sur la régénération des pattes chez *Carcinides* *maenas* L., Crustacé Décapode. *C.R. Ac. Sc.*, 241, pp. 2179-2180.

- ERICKSSON-QUENSEL B., SVEDBERG T. (1936). — The molecular weights and pH-stability regions of the hemocyanins. *Biol. Bull.*, **71**, pp. 498-547.
- FAGE L. (1940). — Sur le déterminisme des caractères sexuels des Lophogastrides (Crustacés, Mysidacés). *C.R. Ac. Sc.*, **211**, pp. 335-337.
- FINE J. M., GROULADE J., SAINT PAUL M., TIZZANI R. J. (1956). — L'électrophorèse sur papier. *Biol. Méd.*, **45**, pp. 591-644.
- FLORKIN M., FRAPPEZ G. (1940). — Concentration de l'ammoniaque « in vivo » et « in vitro » dans le milieu intérieur des Invertébrés. III. Ecrevisse, Hydrophile, Dytique. *Arch. Intern. Physiol.*, **50**, pp. 197-202.
- FRENTZ R. (1954 a). — Electrophorèse sur papier des protéines du sérum de *Carcinus maenas* Pennant. *C.R. Ac. Sc.*, **239**, pp. 1867-1868.
- FRENTZ R. (1954 b). — Quelques données biométriques sur la population de *Carcinus maenas* Pennant de l'Etang de Thau. *Bull. Inst. Océan.*, **51**, pp. 1-26.
- FRENTZ R., VEILLET A. (1958). — Etude immuno-électrophorétique des protéines du sérum de *Carcinus maenas* Pennant. *XVth Intern. Congress Zool.*, London, pp. 555-558.
- GABE M. (1953). — Sur l'existence, chez quelques Crustacés Malacostracés, d'un organe comparable à la glande de mue des Insectes. *C.R. Ac. Sc.*, **239**, pp. 1111-1113.
- GIARD A. (1887). — La castration parasitaire et son influence sur les caractères extérieurs du sexe mâle chez les Crustacés. *Bull. Sc. Fr. Belg.*, **18**, pp. 1-28.
- GIORGANO M. F., HARPER H. A., FILICE F. P. (1950). — The amino-acids of a starfish and a sea urchin (*Asteroidea* and *Echinoidea*). *The Washmann J. Biol.*, **8**, pp. 129-132.
- GOLDSCHMIDT R. (1911). — Le déterminisme du sexe et l'intersexualité. Alcan, éd., Paris.
- GOMORI G. (1952). — The periodic acid Schiff stain. *Amer. J. Clin. Pathol.*, **22**, pp. 277-281.
- GORDON A. H., KEIL B., SEBESTA K. (1949). — Electrophoresis of proteins in agar jelly. *Nature*, **164**, pp. 498-499.
- GRABAR P., WILLIAMS C. A. (1953). — Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunologiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin. *Biochim. Biophys. Acta*, **10**, pp. 193-194.
- GRABAR P., WILLIAMS C. A. (1955). — Méthode immunoélectrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques. *Biochim. Biophys. Acta*, **17**, pp. 67-74.
- GRASSMANN W., HANNIG K. (1950). — Ein einfaches Verfahren zur Analyse der Serumproteine und anderer Proteingemische. *Naturwiss.*, **37**, pp. 496-497.
- GRASSMANN W., HANNIG K. (1952). — Ein quantitatives Verfahren zur Analyse der Serumproteine durch Papierelektrophorese. *Hoppe Seyler's Ztschr. f. physiol. Chem.*, **290**, pp. 1-27.
- HAENE Y. de (1958). — Invloed van de voeding en van de oogsteel hormonen op het normal eiwitbeeld by de chinese Wolhandkrab. in "The protides of biological fluids", 4 - de Colloq. *Sint Jans Hospitaal, Brugge*, pp. 125-134.
- HANSTRÖM B. (1939). — Hormones in Invertebrates. *The Clarendon Press, Oxford*, 198 p.
- HEIM F. (1892). — Etudes sur le sang des Crustacés Décapodes suivies d'un essai sur le rôle des pigments. *Thèse, Fac. Sc., Paris*.
- HOTCHKISS R. D. (1948). — A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structure in fixed tissue preparations. *Arch. Biochem.*, **16**, pp. 131-141.
- HUGHES T. E. (1940). — The effects on the fat and starch metabolism of *Gebia* by the parasite *Gyge branchialis*. *J. exp. Biol.*, **17**, pp. 331-336.
- JOUBERT F. J. (1954). — Haemocyanin of the Crawfish (*Jasus lalandii*). *Biochim. Biophys. Acta*, **14**, pp. 127-135.

- KAMINSKI M. (1954). — Etudes immuno-chimiques et électrophorétiques des globulines du blanc d'œuf de Poule. Caractérisation et essais d'isolement. *Biochim. Biophys. Acta*, 13, pp. 216-223.
- KARLSON P. (1956). — Chemische Untersuchungen über die Metamorphose-Hormone der Insekten. *Ann. Sc. nat. Zool. Biol. an.*, 48, pp. 257-261.
- KERMACK W. O., LEES H., WOOD J. D. (1955). — Some non protein constituents of the tissues of the lobster. *Biochem. J.*, 60, pp. 424-428.
- KNOWLES F. G. W., CARLISLE D. B. (1956). — Endocrine control in the Crustacea. *Biol. Rev.*, 31, pp. 396-473.
- KOCH H. J. A. (1952). — Eye-stalk hormone post-moult volume increase and nitrogen metabolism in the crab *Eriocheir sinensis* (M. Edw.). *Meded. vlaamsche Acad. Kl. Wet.*, 44, p. 3.
- KOIW E., GRONWALL A. (1952). — Staining of protein bound carbohydrates after electrophoresis of serum on filterpaper. *Scand. J. Clin. Inv.*, 4, pp. 244-246.
- KOLLMANN M. (1908). — Recherches sur les leucocytes et le tissu lymphoïde des Invertébrés. *Ann. Sc. nat. Zool.*, 8 (9), pp. 1-240.
- KUMAGAWA M., SUTO K. (1908). — Ein neues Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Fettes und der unverseifbaren Substanzen in tierischem Material nebst der Kritik einiger geräuchlichen Methoden. *Bioch. Zeitschr.*, 8, pp. 212-347.
- KUNKEL H. J., SLATER R. J. (1952). — Zone electrophoresis in a starch medium. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 80, pp. 42-44.
- LELU P. (1938). — Les corrélations humorales chez les Invertébrés. *Actualités biologiques*, Gauthiers-Villars, éd., Paris.
- LEONE C. A. (1953). — Preliminary observations on intraspecific variation of the levels of total protein in the sera of some Decapod Crustacea. *Science*, 118, pp. 295-296.
- LÉVY R. (1923). — Sur la toxicité des tissus de la Sacculine (*Sacculina carcini*) vis-à-vis du Crabe (*Carcinus maenas*) et sur la recherche de réactions d'immunité chez ce dernier. *Bull. Soc. Zool.*, 48, pp. 291-294.
- LÉVY R. (1924). — Sur la constatation de différences d'ordre physico-chimique entre le sérum des Crabes sacculinés et celui des Crabes normaux. *Bull. Soc. Zool.*, 49, pp. 333-336.
- LIPSCHUTZ A. (1924). — The internal secretion of sex glands. W. Heffer, Cambridge.
- MAC CLUNG C. E. (1902). — The accessory chromosome. Sex determinant? *Biol. Bull.*, 3, pp. 43-84.
- MACHEBOEUF M., REBEYROTTE P., BRUNERIE M. (1951). — Application aux sérums pathologiques, aux urines et aux liquides d'ascite (néphrose lipéidique, myélome multiple, cirrhose de Laënnec) de la méthode de microélectrophorèse sur papier. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 33, pp. 1543-1551.
- MORETTI J., BOUSSIER G., JAYLE M. F. (1957). — Réalisation technique et premières applications de l'électrophorèse sur gel d'amidon. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 39, pp. 593-605.
- NEEDHAM A. E. (1955). — Nitrogen excretion in *Carcinides maenas* (Pennant) during the early stage of regeneration. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 3, pp. 189-212.
- NEILAND K. A., SCHEER B. T. (1953). — The influence of fasting and sinus gland removal on body composition of *Hemigrapsus nudus*. P. V. Of the hormonal regulation of metabolism in Crustaceans. *Physiol. Comp. Oecol.*, 4, pp. 321-326.
- OKADA Y. K., MIYASHITA Y. (1935). — Sacculinization in *Eriocheir japonicus* de Haan, with remarks on the occurrence of complete sex-reversal in parasitized male Crabs. *Mem. Coll. Sc. Kyoto Imp. Univ.*, Ser. B, 40, pp. 169-208.
- ORTON J. H. (1936). — Experiments in the Sea on rate of growth of some Crustacea Decapoda. *Journ. Mar. Biol. Ass.*, 20, pp. 673-689.
- OUCHTERNOLY O. (1948). — Antigen antibody reaction in gels. *Ark. Kemi. Miner. Geol. B.*, 26, n° 16.

- LOUDIN J. (1946). — Méthode d'analyse immuno-chimique par précipitation spécifique en milieu gélifié. *C.R. Ac. Sc.*, 222, pp. 115-116.
- PIERRE M. (1935). — L'hépatopancréas des Pagures. *Trav. Stat. biol. Roscoff*, 13, pp. 179-208.
- REINHARD E. G. (1956). — Parasitic castration of Crustacea. *Exp. Parasit.*, 5, pp. 79-107.
- REINHARD F. G., BRAND Th. von (1944). — The fat content of *Pagurus* parasitized by *Peltogaster* and its relation to theories of sacculinization. *Physiol. Zool.*, 17, pp. 31-41.
- REINHARD E. G., BRAND Th. von, MAC DUFFIE S. F. (1947). — Observations on the fat content of hermit crabs parasitized by a Bopyrid. *Proc. Helminth. Soc. Washington*, 14, pp. 69-73.
- RENAUD L. (1949). — Le cycle des réserves organiques chez les Crustacés Décapodes. *Ann. Inst. Océan. Monaco*, 24, pp. 259-357.
- REVERBERI G. (1944-1945). — La determinazione del sesso nei Crostacei e i fenomeni della castrazione parassitaria. *Rend. int. lombardo Sc., Classe Sc. Mat. e Nat.*, 78, pp. 217-246.
- ROBSON G. C. (1911). — The effect of Sacculina on the fat metabolism of its host. *Qu. J. Micr. Sc.*, 57, pp. 267-278.
- ROCHE J., DERRIEN Y. (1939). — Solubilité, état de dispersion et spécificité de diverses hémocyanines. *C.R. Soc. Biol.*, 131, pp. 386-390.
- ROCHE J., DERRIEN Y. (1940). — Recherches sur les propriétés physico-chimiques des hémocyanines. V. Solubilité en présence de sels neutres, état de dispersion et spécificité des hémocyanines de divers animaux. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 22, pp. 7-18.
- RUDLOFF O., VEILLET A. (1954). — Influence du Rhizocéphale *Septosaccus cuenoti* sur le métabolisme lipidique du Pagure *Diogenes pugilator*. *C.R. Soc. Biol.*, 148, pp. 1464-1467.
- SCHEER B. T. (1959). — The hormonal control of metabolism in Crustaceans. IX. Carbohydrate metabolism in the transition from intermoult to premoult in *Carcinus maenas*. *Biol. Bull.*, 116, pp. 175-183.
- SCHEIDEGGER J. J. (1955). — Une microméthode de l'immunoélectrophorèse. *Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 7, pp. 103-110.
- SIMPSON J. W., ALLEN K., AWAPARA J. (1959). — Free amino-acids in some aquatic Invertebrates. *Biol. Bull.*, 117, pp. 370-381.
- SMITH G. (1906). — Rhizocephala. *Fauna und Flora des Golfes von Neapel*, 29, pp. 1-123.
- SMITH G. (1910). — Studies in the experimental analysis of sex. P. 2. On the correlation between primary and secondary characters. *Qu. J. Micr. Sc.*, 54, pp. 577-604.
- SMITH G. (1911). — Studies in the experimental analysis of sex. P. 7. Sexual changes in the blood and liver of *Carcinus maenas*. *Qu. J. Micr. Sc.*, 57, pp. 251-265.
- SMITH G. (1913). — Studies in the experimental analysis of sex. P. 10. The effect of *Sacculina* on the storage of fat and glycogen on the formation of pigment by its host. *Qu. J. Micr. Sc.*, 59, pp. 267-295.
- SMITHIES O. (1955). — Zone electrophoresis in starch gels : group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.*, 61, pp. 629-641.
- SVEDBERG T., PEDERSEN K. O. (1940). — The Ultracentrifuge. Clarendon Press, Oxford.
- SWAHN B. (1953). — Studies on blood lipids. *Scand. J. Clin. Inv., Suppl.* 9, pp. 1-114.
- TEISSIER G. (1938). — Sur la variabilité de la composition sanguine chez les Crabes. *C.R. Soc. Biol.*, 129, pp. 937-938.
- TEISSIER G., VEILLET A. (1939). — Sur le dosage réfractométrique des protides du sang des Crabes. *C.R. Soc. Biol.*, 131, pp. 1195-1198.

- TELFER W. H. (1954). — Immunological studies of Insect metamorphosis. II. The role of a sex-limited blood protein in egg formation by the *Cecropia* silkworm. *J. Gen. Physiol.*, 73, pp. 539-558.
- TISELIUS A., HORSFALL F. L. (1939 a). — Electrophoretic technique. I. Electrophoresis of hemocyanins. *Ark. Kemi. Miner. Geol.*, 13 A, pp. 1-20.
- TISELIUS A., HORSFALL F. L. (1939 b). — Mixed molecules of hemocyanins from two different species. *J. Exp. Med.*, 69, pp. 83-101.
- TRAVIS D. F. (1955). — The molting cycle of the spiny lobster, *Panulirus argus* Latreille. III. Physiological changes which occur in the blood and urine during the normal molting cycle. *Biol. Bull.*, 109, pp. 484-503.
- TUCKER B. W. (1930). — On the effects of an Epicaridian parasite *Gyge branchialis* on *Upogebia littoralis*. *Qu. J. Micr. Sc.*, 74, pp. 1-118.
- TYLER A., METZ A. (1945). — Natural heteroagglutinins in the serum of the spiny lobster, *Panulirus interruptus*. I. Taxonomic range of activity, electrophoretic and immunizing properties. *J. Exp. Zool.*, 100, pp. 387-406.
- TYLER A., SCHEER B. T. (1945). — Natural heteroagglutinins in the serum of the spiny lobster, *Panulirus interruptus*. II. Chemical and antigenic relations to blood proteins. *Biol. Bull.*, 89, pp. 193-200.
- URIEL J., SCHEIDEGGER J. J. (1955). — Electrophorèse en gélose et coloration des constituants. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 37, pp. 165-170.
- VAN OORDT G. J. (1928). — Über die Abhängigkeit der Geschlechtsunterschiede von der Geschlechtsdrüse bei der Krabbe *Inachus*. *Zool. Anz.*, 76, pp. 306-310.
- VEILLET A. (1945). — Recherches sur le parasitisme des Crabes et des Galathées par les Rhizocéphales et les Epicarides. *Ann. Inst. Océan. Monaco*, 22, pp. 193-341.
- VEILLET A. (1955). — Remarque sur l'influence de la Sacculine sur les organes endocrines des Crabes. *Bull. Soc. Sc. Nancy*, 14, pp. 73-74.
- VEILLET A., DEMEUSY N. (1955). — Utilisation des matières plastiques dans les installations d'élevage d'animaux marins. *Bull. Inst. Océan. Monaco*, 240, pp. 360-361.
- VERNET-CORNUBERT G. (1958). — Recherches sur la sexualité du Crabe *Pachygrapsus marmoratus* (Fabricius). *Arch. Zool. Exp. Gén.*, 96, pp. 101-276.
- WOODS K. R., PAULSEN E. C., ENGLE R. L., PERT J. H. (1958). — Starch gel electrophoresis of some Invertebrate sera. *Science*, 127, pp. 519-520.
- ZUCKERKANDL E. (1958). — Hémocyanine et cuivre chez un Crustacé Décapode dans leurs rapports avec le cycle d'intermue. *Thèse, Fac. Sc., Paris*, sous presse.

DEUXIEME THESE

Proposition donnée par la Faculté :

PROPRIETES IMMUNOLOGIQUES
DES PROTEINES VEGETALES

VU ET APPROUVÉ :

Nancy, le 15 mars 1960.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

E. URION.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Nancy, le 16 mars 1960.

Le Recteur de l'Académie de Nancy,

G. MAYER.

